

Jan Olejniczak, Elżbieta Adamska

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Indukowanie zmienności cech jakościowych oleju gorczycy białej (*Sinapis alba* L.)

Induced variability of oil quality characters in white mustard (*Sinapis alba* L.)

Słowa kluczowe: gorczyca biała, *Sinapis alba*, mutanty, kwasy tłuszczowe, tokoferole

Key words: white mustard, *Sinapis alba*, mutants, fatty acids, tocopherols

Nasiona gorczycy białej zawierają oleje o wysokiej zawartości kwasu erukowego, który ma szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym, dlatego też roślina ta może być alternatywnym źródłem kwasu erukowego w stosunku do rzepaku ozimego. O stabilności fizjologicznej oleju decyduje odpowiedni skład kwasów tłuszczowych i tokoferoli. Celem pracy była ocena mutantów gorczycy białej pokolenia M₄ pod względem zawartości w nasionach oleju, białka, tokoferoli oraz składu kwasów tłuszczowych i tokoferoli. Materiał do badań stanowiły mutanty morfologiczne pokolenia M₃ wyselekcjonowane z dwóch odmian Borowska i Ascot po działaniu promieni gamma (γ), azydki sodu (AS) i N-nitrozo-N-metylomocznika (MNU). Przeprowadzona analiza zawartości oleju i białka w nasionach M₄, wykonana metodą rezonansu podczerwieni (NIRS), wykazała nieznaczne zwiększenie zakresów zmienności poszczególnych składników chemicznych. Skład kwasów tłuszczowych określono metodą GLC, analizując próbkę 50 mg nasion oraz pojedyncze nasiona. U badanych form wyjściowych (Borowska, Ascot) nie stwierdzono wyraźnych różnic w zawartości kwasów tłuszczowych przy dwóch zastosowanych metodach, natomiast zaobserwowano wyraźne różnicowanie u kilku morfotypów wśród badanych mutantów. Kilka mutantów (2/3, 2/26, 3/1 i 5/8) wykazało kilkunastoprocentowe zwiększenie za-

Seeds of white mustard contain oil with high erucic acid content widely used in chemical industry. Thus this species could be a source of erucic acid alternative to rapeseed (HEAR). Physiological stability of oil is determined by fatty acid and tocopherol composition. A collection of morphological M3 mutants selected from two cultivars Borowska and Ascot, after treatment with gamma rays (γ) sodium azid (SA) and N-nitroso-N-methylurea (MNU) was used as material in the studies on evaluation of oil, protein and tocopherol content in white mustard. Analysis of oil and protein determined by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) showed a small increase of variation for analysed chemical compounds. Fatty acid composition was estimated with GLC method using 50 mg samples of seeds or single seed. Analyses of initial forms showed no difference between them using neither of these methods, but great variability was found among mutants. Several mutants (2/3, 2/26, 3/1 and 5/8) demonstrated increased content of erucic acid as compared to variety Ascot, accompanied with decrease of oleic acid. Some other forms (13/1, 16/2 and 17/1) showed distinct increase of C_{22:1} comparing to the cultivar Borowska (33.5–33.9%) respectively. Tocopherol contents estimated by high performance liquid chromatography (HPLC) were strongly affected

wartości kwasu erukowego w porównaniu do formy wyjściowej Ascot, przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości głównie kwasu oleinowego. U kilku innych form (13/1, 16/2 i 17/1) stwierdzono wyraźne zwiększenie zawartości kwasu $C_{22:1}$ w porównaniu do odmiany wyjściowej Borowska (33,5–33,9%). Wykonana analiza zawartości tokoferoli metodą HPLC wykazała zróżnicowanie w zawartości tego składnika w odniesieniu do form wyjściowych. W nasionach dwóch mutantów 2/267 i 5/8 stwierdzono zwiększenie zawartości tokoferoli odpowiednio do 192 i 198 mg/kg w porównaniu do formy wyjściowej Ascot, która zawierała tylko 172 mg/kg. Podobnie u mutantów 13/1, 14/6, 14/7 wyprowadzonych z odmiany Borowska również uzyskano wzrost ogólnej zawartości tokoferoli. Najkorzystniejszy stosunek frakcji tokoferoli α/γ stwierdzono u mutantów 17/1 i 16/2.

as compared to the varieties. Seeds of two mutants 2/26 and 5/8 showed tocopherol content increased to 192 mg/kg and 198 mg/kg respectively as compared to Ascot variety 172 mg/kg. Similar effect was found with 13/1, 14/6 and 14/7 mutants selected from Borowska cultivar. A few mutants (17/1 and 16/2) showed higher α/γ tocopherol ratio.

Wstęp

Nasiona gorczycy białej zawierają oleje o wysokiej zawartości kwasu erukowego, który ma szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym. Zlikwidowanie w północno-wschodniej Polsce jedyne zamkniętego rejonu uprawy rzepaku wysokoerukowego sprawiło, iż gorczyca biała może być alternatywnym źródłem pozyskiwania olejów zawierających kwas erukowy. O wartości przemysłowej nasion gorczycy decyduje zawartość oleju, skład kwasów tłuszczowych, a szczególnie zawartość kwasu erukowego oraz poziom tokoferoli. Wysoka zawartość tokoferoli ma istotny wpływ na stabilność oksydacyjną i fizjologiczną wartość olejów.

Celem pracy była ocena mutantów gorczycy białej pokolenia M_4 pod względem zawartości w nasionach oleju, białka i tokoferoli oraz spektrum kwasów tłuszczowych i tokoferoli.

Material i metody

Material do badań stanowiły mutanty morfologiczne M_3 wyselekcjonowane z dużych populacji ramszowych roślin odmiany Borowska i Ascot (Olejniczak, Adamska 1999). Nasiona mutantów pokolenia M_4 otrzymane w wyniku działania promieniami gamma (γ) oraz mutagenów chemicznych: azydku sodu (AS) i N-nitrozo-N-metylomocznika (MNU) analizowano na zawartość oleju i białka

metodą spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIRS — *near infrared reflectance spectroscopy*). Zawartość oleju i białka oznaczono dla próbek nasion wielkości 250 g. Dla wybranych nasion mutantów M₄ zebranych z pojedynczych roślin wykonano analizy zawartości kwasów tłuszczowych, tj.: kwasu palmitynowego (C_{16:0}), stearynowego (C_{18:0}), oleinowego (C_{18:1}), linolowego (C_{18:2}), linolenowego (C_{18:3}) i erukowego (C_{22:1}) metodą chromatografii gazowej GLC (Thies 1971). Stosując pierwszą metodyfikację GLC (I) analizowano połówki nasion, natomiast dla drugiej metodyfikacji (II) niezbędna była próba 50 mg nasion. Spośród kilkudziesięciu mutantów M₄ wybrano kilkanaście form do dalszych analiz biochemicznych. Ogólną zawartość tokoferoli oraz frakcji alfa i gamma określono metodą HPLC (Thies 1997) na próbach wielkości 50 mg wraz z dodatkiem jako wzorca β tokoferolu.

Wyniki i dyskusja

Analiza zawartości oleju i białka (tab. 1) metodą spektrometrii w bliskiej podczerwieni (NIRS) w nasionach odmian wyjściowych (Borowska i Ascot) oraz mutantów pokolenia M₄ wykazała u mutantów nieznaczne zwiększenie zmienności podanych parametrów chemicznych w porównaniu do form wyjściowych. Wyjątek stanowiły nasiona mutantu M-2/3, które wykazały wyraźne zwiększenie zawartości oleju (33%) w porównaniu do odmiany Ascot (27,7%).

Mutant 17/3 wyselekcjonowany po traktowaniu mutagenem odmiany Borowska charakteryzował się natomiast zwiększoną zawartością białka. Niewielkie zwiększenie zmienności tej cechy u badanych mutantów wytłumaczyć można tym, że selekcja wśród populacji prowadzona była głównie w oparciu o zmiany cech morfologicznych. Metoda NIRS została wykorzystana tylko do oceny zawartości białka i oleju, ponieważ zbadane składy kwasów tłuszczowych różniły się bardzo istotnie zawartością w porównaniu do metody GLC.

Jednak wyniki badań Goffmana i in. (1999) wskazują, że tą metodą można określić spektrum kwasów tłuszczowych dla danego gatunku kalibrując uprzednio spektroskop w oparciu o wzorce. Wykorzystując metodę NIRS Velasco i in. (1995) wyselekcjonowali mutanty *B. carinata* o niskiej zawartości kwasu erukowego (poniżej 10%). Formy gorczycy białej o obniżonej zawartości kwasu erukowego otrzymali również Krzymański i in. (1991) oraz Piętka i in. (1998), analizując połówki nasion metodą chromatografii gazowej. Metody mutacyjne są często wykorzystywane w hodowli dla polepszenia jakości oleju u roślin oleistych, (Röbbelen 1990, Ashri 1992, Byczyńska i in. 1996, Olejniczak i in. 2000).

Tabela 1

Zawartość oleju oraz białka w nasionach form wyjściowych i wybranych mutantów M_4 gorczycy białej (*Sinapis alba*) oznaczonych metodą spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIRS) — *Mean values of oil and protein contents in the seed oil of initial cultivar of white mustard and M_4 mutants determined by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS)*

Formy — <i>Forms</i>	Olej — <i>Oil</i> [%]	Białko — <i>Protein</i> [%]
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Ascot	27,7	31,5
M-2/3	33,0	33,3
M-2/26	22,9	33,0
M-3/1	24,9	32,2
M-3/7	23,1	33,1
M-3/20	23,3	31,6
M-5/8	27,9	29,6
M-6/2	26,9	29,2
M-7/12	25,3	31,3
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Borowska	25,6	30,3
M-12/2	27,3	29,9
M-12/3	25,7	30,2
M-13/1	23,7	31,1
M-14/6	28,3	28,0
M-14/7	24,4	30,9
M-16/2	23,1	31,8
M-17/1	22,9	31,7
M-17/3	23,7	32,3

Otrzymane mutanty (tab. 2) różniły się zawartością poszczególnych kwasów tłuszczowych, a szczególnie kwasu oleinowego ($C_{18:1}$) i erukowego ($C_{22:1}$), w odniesieniu do form wyjściowych. U niektórych mutantów (2/3, 2/26, 3/1 i 5/8) zaobserwowano kilkuprocentowe zwiększenie kwasu erukowego przy jednoczesnym zmniejszeniu kwasu oleinowego ($C_{18:1}$). Formy 13/1, 16/2 oraz 17/1 charakteryzowały się podwyższoną zawartością kwasu erukowego w porównaniu do odmiany wyjściowej Borowska.

Porównując dwie metody analizy kwasów tłuszczowych tj. połówką i z próbą 50 mg nasion stwierdzono duże różnice badając tego samego mutantą. Przyczyny należy szukać w braku całkowitej homozygotyczności nasion mutantów M_4 pod względem wyindukowanych mutacji.

Tabela 2

Zawartość kwasów tłuszczowych w nasionach odmian wyjściowych i mutantów M_4 gorczycy białej (% w oleju) — *Fatty acids contents of initial varieties and M_4 mutants of white mustard (percent of oil)*

Formy <i>Forms</i>	Kwasy — Acids											
	C _{16:0} palmitynowy <i>palmitic</i>		C _{18:0} stearynowy <i>stearic</i>		C _{18:1} oleinowy <i>oleic</i>		C _{18:2} linolowy <i>linoleic</i>		C _{18:3} linolenowy <i>linolenic</i>		C _{22:1} erukowy <i>erucic</i>	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Ascot												
Ascot	2,6	3,4	1,3	0,7	21,9	21,4	10,7	10,7	15,5	14,7	37,2	33,1
M-2/3	2,3	3,3	1,0	0,8	23,2	21,5	10,4	10,8	11,9	11,6	39,8	40,6
M-2/26	2,7	2,9	1,0	0,6	16,7	15,0	11,0	11,2	19,9	14,9	39,2	45,9
M-3/1	2,6	2,6	1,1	0,8	20,4	19,5	11,0	12,6	14,3	10,1	40,0	43,8
M-3/7	2,6	3,2	0,9	0,6	15,8	15,8	12,5	11,4	20,0	17,3	39,1	42,0
M-3/20	2,8	3,4	1,0	0,7	15,0	15,0	11,4	14,4	19,5	13,2	41,0	34,6
M-5/8	2,5	2,6	1,0	0,5	18,2	18,2	10,5	9,9	15,3	12,3	42,3	48,3
M-6/2	2,5	2,6	1,0	0,7	19,4	19,4	9,7	10,3	15,8	17,2	40,5	30,5
M-7/12	3,1	3,0	1,2	0,7	16,7	16,7	12,1	10,7	17,6	15,8	38,5	35,5
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Borowska												
Borowska	2,6	3,1	1,2	0,9	28,8	26,6	9,6	13,0	11,7	11,5	33,9	33,5
M-12/2	2,1	3,0	0,9	0,8	32,7	32,5	12,6	14,0	13,2	15,3	29,5	25,8
M-12/3	2,3	3,1	1,1	0,7	25,9	22,9	9,5	10,8	13,2	12,0	37,3	39,7
M-13/1	2,7	3,0	1,1	0,6	19,8	16,5	11,1	11,5	16,3	15,0	38,1	44,4
M-14/6	2,6	2,8	1,0	0,7	27,1	10,4	10,4	9,8	13,1	11,5	35,7	36,2
M-14/7	2,3	3,1	1,1	0,7	19,6	10,8	10,8	11,3	17,2	14,8	38,7	34,6
M-16/2	2,5	2,6	1,0	0,5	14,5	10,0	10,0	11,2	17,2	14,8	45,9	51,6
M-17/1	2,5	2,7	1,1	0,6	19,0	12,1	12,1	10,7	15,7	15,0	39,4	39,7
M-17/3	2,5	2,6	1,2	0,9	20,5	12,0	12,0	13,1	17,2	13,3	37,8	35,7

I. Metoda połówkowa — *Half seed method*

II. Metoda analizy na próbce nasion 50 mg — *Analysis of 50 mg seed samples*

Wykonana analiza zawartości tokoferoli metodą HPLC (tab. 3) wykazała różnicowanie w zawartości tego składnika w odniesieniu do form wyjściowych. W nasionach dwóch mutantów 2/26 i 5/8 stwierdzono zwiększenie zawartości tokoferoli, odpowiednio do 192 i 198 jednostek w porównaniu do formy wyjściowej Ascot, która zawierała tylko 172 jednostek. Podobnie u mutantów 13/1, 14/6, 14/7 i 17/1, wyprowadzonych z odmiany Borowska, również uzyskano wzrost ogólnej zawartości tokoferoli. Najkorzystniejszy stosunek α/γ tokoferolu stwierdzono u mutantów 17/1 i 16/2. Podobną zmienność w zawartości i składzie

tokoferoli stwierdzili Olejniczak i in. (2000) u rzepaku ozimego wysokoerukowego. Bardzo dużą zmienność w zawartości tokoferoli u różnych gatunków z rodziny kapustnych uzyskał Goffman i in. (1999).

Otrzymane mutanty stanowią materiał do dalszych badań biochemiczno-hodowlanych.

Tabela 3
Ogólna zawartość tokoferoli oraz ich frakcji w nasionach odmian wyjściowych gorczycy białej i mutantów M_4 w mg/kg nasion — *Total content and spectrum of tocopherol in seeds of parent varieties and M_4 mutants of white mustard in mg/kg*

Formy <i>Forms</i>	Ogólna zawartość tokoferoli <i>Total content of tocopherol</i> [mg/kg]	α	γ	Stosunek α/γ <i>Ratio α/γ</i>
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Ascot				
Ascot	172	12	158	0,07
M-2/3	154	17	136	0,13
M-2/26	192	16	176	0,09
M-3/1	163	13	150	0,09
M-3/7	168	21	148	0,14
M-3/20	177	22	154	0,14
M-5/8	198	19	179	0,10
M-6/2	178	19	160	0,12
M-7/12	174	21	153	0,14
Forma wyjściowa — <i>Initial variety</i> — Borowska				
Borowska	163	16	147	0,11
M-12/2	177	13	161	0,08
M-12/3	163	12	151	0,08
M-13/1	187	30	157	0,19
M-14/6	191	15	174	0,09
M-14/7	189	27	163	0,16
M-16/2	171	37	134	0,28
M-17/1	195	38	157	0,34
M-17/3	154	18	136	0,13

Wnioski

1. Wyselekcjonowane mutanty gorczycy białej charakteryzowały się znacznym zwiększeniem zawartości kwasu erukowego.
2. Otrzymano dwa mutanty o korzystnym stosunku α/γ tokoferoli.

Literatura

- Ashri A. 1992. Mutation breeding of oil crops. Proc.of Joint FAO/IAEA. Seminar, 23-25 May Lagaroza Spain, 1-9.
- Goffman D., Thies W., Velasco L. 1999. Chemotaxonomic value o tocopherols in *Brassicaceae* Phytoch. 50: 793-798.
- Krzymański J., Piętka T., Ratajska I., Byczyńska B., Krótka K. 1991. Development of low glucosinolate White Mustard (*Sinapis alba* L. syn. *Brassica hirta*). GCIRC. Eight International Rapeseed Congress. 9-11. VII, 1991, Saskatoon, Canada. Volume 5 of 6: 1545-1548.
- Olejniczak J., Adamska E. 1999. Efekt działania różnych mutagenów w pokoleniu M₁ i M₂ gorczycy białej (*Sinapis alba* L.). Rośliny Oleiste XX: 253-260.
- Olejniczak J., Möller Ch., Adamska E., Goffman F. 2000. Increasing of the variability for oil, protein, glucosinolate and tocopherol content through chemically induced mutation in *Brassica napus* L. 3rd International Crop Science Congress Meeting Future Human Needs. 17-22 August, 2000, Hamburg, Germany (w druku).
- Piętka T., Krzymbański J., Michalski K., Krótka K. 1998. Postępy prac nad tworzeniem gorczycy białej podwójnie ulepszonej. Rośliny Oleiste XIX: 455-462.
- Röbbelen G. 1990 Mutation breeding for quality improvement. A case of study for oil crops. Mut. Breed. Rev. 6: 1-42.
- Thies W. 1971. Schnelle und einfache Analysen der Fettsoürezusammensetzung in einzelnen Raps-kotyledonen. I. Gaschromatographische und Papierchromatographische Methoden. Z. Pflanzenzücht. 65: 181-202.
- Thies W. 1997. Entwicklung von Ausgangmaterial mit erhöhten alfa oder gamma-Tocopherol. Gehalten in Samenöl für die Kornerraps-Züchtung. I. Quantitative Bestimmung der Tocopherol durch HPLC. Angew. Bot. 71: 62-67.
- Velasco L., Fernandez-Martinez J., De Haro A. 1995. Isolation of induced mutants in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* Braun) with low levels of erucic acid. Plant. Breed. 114: 454-456.