

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA SPEKTROMETRII ODBICIOWEJ
W BLISKIEJ PODCZERWIENI (NIRS) DLA ANALIZ CECH
JAKOŚCIOWYCH I ILOŚCIOWYCH NASION RZEPAKU OZIMEGO
(*BRASSICA NAPUS L.*)

J. Olejniczak¹, A. Wojciechowski², T. Zum Felde³, C. Möllers³

¹Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

e-mail: jole@igr.poznan.pl

²Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

e-mail: ajwoj@au.poznan.pl

³Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Geor-August-Universität

Von-Siebold-Str. 8, D-37075 Göttingen, Germany

Streszczenie. W prezentowanej pracy przy użyciu metody NIRS analizowano 6552 mutanty pokolenia M₄. Zawartość oleju wahała się od 23,1 do 54,6%, białka od 15,1-32,0%, glukozyzolanów od 0,2-140,6 mM·g⁻¹, sinapiny od 0,36-1,71%, a kwasu fitynowego od 9,9-14,4%. Generalnie stwierdzono wyraźne zwiększenie zmienności badanych cech u mutantów w porównaniu do linii wyjściowej DH-0120. U kilku wybranych mutantów wykonano dodatkowo analizy metodą HPLC i GLC celem oszacowania wiarygodności wyników otrzymanych przy zastosowaniu metody NIRS. W badanych nasionach największe, kilkunasto procentowe zróżnicowanie stwierdzono w spektrum kwasów tłuszczowych.

Słowa kluczowe: NIRS, rzepak, sinapina, glukozyzolan, kwasy tłuszczowe.

WSTĘP

W związku z nadprodukcją zbóż w świecie jak i również w Polsce, obserwuje się tendencje wyraźnego zwiększenia zainteresowania olejem rzepakowym, ze szczególnym zwróceniem uwagi na jakość, która musi być inna w przypadku użycia dla celów przemysłowych, a inna dla celów spożywczych [8,27]. Wartość pokarmowa i przemysłowa nasion rzepaku zależy od zawartości oleju, białka

i składników antyżywniowych (glukozynolany, sinapina, kwas fitynowy) oraz spektrum kwasów tłuszczowych. Glukozynolany są w sferze zainteresowań hodowców ze względu na fakt, że ich obecność w mączce rzepakowej obniża jej wartość pokarmową. U zwierząt gospodarskich glukozynolany są przyczyną wielu schorzeń żołądka, nerek i tarczycy [13]. W 1973 roku Hobson-Frohock i inn. wykazali, że "rybi zapach" jaki niekiedy występuje w kurzych jajach o brązowej skorupie spowodowany jest karmieniem drobiu mączką rzepakową zawierającą sinapinę [9]). Późniejsze prace [8,26] wykazały, że w obrębie rodzaju *Brassica* istnieje duża zmienność w zawartości sinapiny oraz, że istnieje możliwość selekcji form o obniżonej zawartości tego składnika. Kwas fitynowy w nasionach rzepaku wiąże makro- i mikroelementy (Ca, K, P, Cu, Zn, Mn, Fe), które z punktu widzenia dobra rośliny są pożądane, gdyż odgrywają istotną rolę podczas kiełkowania nasion. Są jednak niepożądane, zwłaszcza ze względów środowiskowych, ponieważ wszystkie zwierzęta poza przeżuwaczami nie potrafią wykorzystać pierwiastków powiązanych z kwasem fitynowym i wydalają je do środowiska. Stanowi to istotny problem przy wielkotowarowej produkcji zwierzęcej [10]. Sukces w pracach hodowlanych poprawiających cechy jakościowe nasion uzależniony jest od dostępności odpowiednich metod pozwalających je zmierzyć. W przypadku hodowli jakościowej rzepaku znaczący postęp dokonał się po opracowaniu metod chromatograficznych pozwalających ocenić skład kwasów tłuszczowych na podstawie analizy połowy nasiona [4,5], co przyczyniło się znacznie dla poprawienia jakości oleju rzepakowego [13]. Opracowanie taniej i szybkiej metody pozwalającej ocenić zawartość związków chemicznych w nasionach rzepaku nie niszczącej genotypu rozpoczęto już w latach 80-tych [2,3,12]. Ma to szczególne znaczenie w hodowli mutacyjnej, która wymaga analiz olbrzymich populacji roślin. Metody analiz chemicznych, takie jak wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) czy chromatografia gazowa (GLC) są pracochłonne, kosztowne i niszczące jednocześnie badany genotyp. Stąd też praktyka hodowlana dla szybkiej realizacji programów poprawiających jakość nasion potrzebuje metod nie uszkadzających badanego genotypu. Taką metodą przydatną dla oceny cech bez uszkadzania genotypu dla niektórych gatunków okazała się metoda spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni NIRS [1,6,7,20,21,22,24].

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności metody NIRS dla określenia zawartości glukozynolanów, sinapiny, kwasu fitynowego i kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły mutanty pokolenia M_4 otrzymane w wyniku traktowania nasion linii DH-0120, N-nitrozo-N-metylo – mocznikiem (NMU) i azydkiem sodu (SA) w dawkach 1,5 i 2,5 mM przez 3 godziny oraz linia wyjściowa DH-0120. Analizy wykonano przy użyciu spektrofotometru (NIRS model 6500, NIR system Inc., Silversprings, MD, USA). Spektra odbiciowe ($\log 1/R$) w zakresie od 400 do 2500 nm mierzono przy interwale 2 nm. Każda analizowana próba zawierała około 300 mg całych nasion. Ogółem, przy zastosowaniu metody spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIRS) analizowano zawartość oleju, białka, glukozyolanów, sinapiny i kwasu fitynowego w próbach nasion zebranych z 6552 samozapylanych mutantów pokolenia M_4 . Mutanty te rosły na polu doświadczalnym Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerekwicy w sezonie wegetacyjnym 1999/2000.

Na podstawie zawartości glukozyolanów i sinapiny otrzymanych z analiz NIRS wyselekcjonowano mutanty o obniżonej zawartości tych składników. Mutanty te posłużyły dla wykonania analiz porównawczych metodami NIRS, HPLC (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa) i GLC (chromatografia gazowa). Zawartość glukozyolanów i sinapiny określono metodą HPLC, gdzie odpowiednio 100 i 20 mg nasion po zmieleniu poddano ekstrakcji zgodnie z metodą opisaną przez Thies [18,19]. Skład kwasów tłuszczowych oceniono metodą GLC na próbach przygotowanych według metody podanej przez Thies [17] przy użyciu modelu chromatografu gazowego Perkin-Elmer 800.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wśród analizowanych form mutantów stwierdzono wyraźne zwiększenie zakresu zmienności badanych cech w porównaniu do homozygotycznej linii wyjściowej DH-0120 (Tab. 1). U badanych mutantów największy zakres zmienności stwierdzono odnośnie zawartości glukozyolanów ($0,2-140,6 \mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$) i sinapiny ($0,36-1,71\%$). Zawartość oleju u mutantów wahała się od $23,1-54,6\%$, białka od $15,01$ do $32,06\%$ a kwasu fitynowego od $9,9-14,4\%$. Podobne znaczne zwiększenie zakresu zmienności tak cech ilościowych jak i jakościowych u rzepaku po zastosowaniu mutagenów opisują tacy autorzy jak: Syed i inn. [16], Röbbelen [13,14] oraz Spasibionek i inn. [15]. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy jak i dane literaturowe dowodzą możliwości otrzymania ulepszonych odmian rzepaku na drodze bezpośredniej mutagenozy lub też dalszej hodowli rekombinacyjnej.

Analiza porównawcza glukozynolanów oraz kwasów tłuszczowych (Tab. 2) wykonana metodą NIRS oraz GLC wykazała kilkunasto procentowe różnice pomiędzy wynikami otrzymanymi przy zastosowaniu tych metod. Podobną zależność obserwowano w zawartości glukozynolanów i sinapiny u analizowanych mutantów z grupy J wykonanych metodą NIRS i HPLC (Tab. 3). Różnice te spowodowane zostały warunkami pomiarowymi NIRS (wilgotność i temperatura otoczenia w trakcie pomiaru oraz wilgotnością nasion). Podobne próby wykorzystania metody NIRS do analiz związków antyżywniowych (glukozynolany, sinapina) przedstawili Velasco i Becker [21], Velasco i Möllers [24], Velasco i Möllers [25]. Wymienieni wyżej autorzy obserwowali różnice pomiędzy wartościami analizowanych cech po zastosowaniu podobnych metod analiz jak w prezentowanej pracy. Nie umniejsza to jednak wartości NIRS jako skutecznej, szybkiej i tańszej metody selekcji materiałów roślinnych w porównaniu z bardziej dokładnymi, ale drogimi i niszczącymi nasiona jak np. HPLC. Zwłaszcza, jeśli selekcja prowadzona jest na dużych populacjach we wczesnych pokoleniach mutacyjnych.

Badania zawartości kwasu fitynowego oznaczone w nasionach mutantów rzepaku metodą NIRS nie wykazały znaczącego zróżnicowania, ponieważ wstępną kalibrację spektrometru dokonano w oparciu o kolorymetryczne oznaczenie zawartości tego składnika. W dalszych badaniach zamierza się dokonać kalibracji spektrometru w oparciu o analizy HPLC dotyczące zawartości kwasu fitynowego, co pozwoli na dokładniejszy odczyt danych.

Tabela 1. Zmienność zawartości oleju, białka, glukozynolanów (*gls*), sinapiny oraz kwasu fitynowego w nasionach mutantów rzepaku ozimego (pokolenie M_4) i form kontrolnych (linia DH-0120) oszacowana metodą NIRS

Table 1. Variability in oil, protein, glucosinolates (*gls*), sinapine and phytic acid content in seeds of winter oilseed rape mutants (M_4 generation) and control forms (line DH-0120) estimated by NIRS method

Formy	Liczba roślin	Zawartość analizowanych składników				
		olej [%]	białko [%]	<i>gls</i> [$\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$]	sinapina [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Kwas fitynowy [%]
DH-0120	42	44,00±1,0	24,0±1,2	8,0±1,4	0,80±0,06	11,0±0,5
mutanty	6552	23,08-54,63	15,01-32,06	0,2-140,6	0,36-1,71	9,9-14,42

Tabela 2. Zawartość glukozynolanów (*gls*) oraz kwasów tłuszczowych w nasionach mutantów rzepaku ozimego (mutanty M₄ wybrane na podstawie analiz NIRS z obniżoną zawartością *gls*) i formy kontrolnej (linia DH-0120) analizowana metodą NIRS, HPLC i GLC

Table 2. The content of glucosinolates (*gls*) and fatty acids in seeds of winter oilseed rape mutants (mutants with reduced content of *gls* chosen after NIRS analyses) and control form (line DH-0120) estimated by NIRS, HPLC and GLC method

Formy	<i>gls</i> [$\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$]		Kwasy tłuszczowe [%]							
	metoda NIRS	metoda HPLC	C18 : 1*		C18 : 2*		C18 : 3*		C22 : 1*	
			metoda NIRS	metoda GLC	metoda NIRS	metoda GLC	metoda NIRS	metoda GLC	metoda NIRS	metoda GLC
DH-0120	11,8	8,8	47,0	54,8	25,5	24,2	6,3	10,6	-0,5	0,0
mutanty										
G - 1	8,3	5,2	56,1	63,6	27,6	19,3	8,0	7,4	-9,0	0,0
G - 2	12,5	6,6	56,1	61,7	27,5	19,8	9,2	8,3	-8,7	0,0
G - 3	9,3	6,3	58,5	65,8	22,8	17,9	8,7	6,9	-6,1	0,0
G - 4	4,9	5,5	57,1	68,3	24,8	17,2	7,9	6,7	-8,8	0,0
G - 5	6,7	6,6	59,0	60,0	28,0	20,5	10,2	7,0	-11,4	0,0
G - 6	6,9	7,4	56,0	66,9	20,2	17,3	7,8	5,8	-11,5	0,0
G - 7	7,8	6,5	64,0	68,8	18,4	16,0	6,4	5,9	-8,7	0,0
G - 8	4,1	7,6	60,4	68,6	22,2	16,6	6,2	5,1	-8,4	0,0
G - 9	6,5	5,4	60,3	65,8	22,1	17,7	6,5	6,4	-8,3	0,0
G - 10	7,2	5,6	53,9	68,1	25,9	16,0	8,3	5,9	-7,6	0,0
G - 11	4,1	5,7	55,0	67,5	21,7	16,7	6,1	6,2	-7,9	0,0

*/ C18:1 – kwas oleinowy, C18:2 – kwas linolowy, C18:3 – kwas linolenowy, C22:1 – kwas erukowy

Tabela 3. Zawartość glukozynolanów (*gls*), sinapiny oraz kwasu fitynowego w nasionach wybranych linii rzepaku ozimego (mutanty M₄ z obniżoną zawartością *gls*) i formy kontrolnej (linia DH-0120) analizowana metodą NIRS i HPLC

Table 3. The content of glucosinolates (*gls*), sinapine and phytic acid in seeds of chosen lines of winter oilseed rape (M₄ mutants with reduced *gls* content) estimated by NIRS and HPLC method

Formy	<i>gls</i> [$\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$]		Sinapina [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]		Kwas fitynowy [%]
	metoda NIRS	metoda HPLC	metoda NIRS	metoda HPLC	metoda NIRS
DH-0120	11,78	8,80	8,61	6,81	12,77
linie					
J - 1	1,10	6,60	0,38	6,61	12,98
J - 2	1,15	5,60	0,41	7,45	11,67
J - 3	1,29	7,60	0,45	9,62	11,71
J - 4	4,46	7,20	6,97	7,47	12,05
J - 5	5,20	9,70	5,86	7,87	11,59
J - 6	2,20	7,30	2,21	9,30	11,60

WNIOSKI

1. Analiza zawartości składników biochemicznych w nasionach rzepaku wykonana metodą NIRS jest bardzo efektywną, tanią i nie niszczącą badanego genotypu.
2. NIRS, pomimo różnic obserwowanych przy oznaczeniach innymi metodami, można z powodzeniem rekomendować dla wstępnej, szybkiej selekcji pożądanych genotypów.

PIŚMIENNICTWO

1. **Abe H., Kusama T., Kawano S., Iwamoto M.:** Nondestructive determination of protein content in a single kernel of wheat and soybean by near infrared spectroscopy. In: A.M.C. Davies & P. Williams (Eds), *Near Infrared Spectroscopy: the Future Waves*, NIR Publications, Chester, UK, 457-461, 1995.
2. **Daun J., Clear K., Williams P.:** Comparison of three whole seed near-infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. *J Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1063-1068, 1994.
3. **Daun J., Williams P.:** Use of NIR spectroscopy to determine quality factors in harvest survey of canola. In: *Proc 9th Int Rapeseed Congr*, Cambridge, UK, 864-866, 1995.
4. **Downey R.K., Harvey B.L.:** Methods of breeding for oil quality in rape. *Can. J Plant Sci.*, 43, 271-275, 1963.
5. **Downey R.K., Röbbelen G.:** *Brassica Species*. In: R.K. Downey, G. Röbbelen, and A. Ashri (eds), *Oil Crops of the World*, McGraw-Hill, USA, 339-362, 1989.
6. **Fontaine J., Schirmer B., Horr J.:** Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) enables the fast and accurate prediction of essential amino acid contents. 2. Results for wheat, barley, corn, triticale, wheat bran/middlings, rice bran, and sorghum. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50(14), 3902-3911, 2002.
7. **Hicks C., Tuinstra MR., Pedersen J.F., Dowell F.E., Kofoid K.D.:** Genetic analysis of feed quality and seed weight of sorghum inbred lines and hybrids using analytical methods and NIRS. *Euphytica*, 127(1), 31-40, 2002.
8. **Jourden C., Simoneaux D., Renard M.:** Selection of pollen for linolenic acid content in rapeseed, *Brassica napus L.*, *Plant Breeding*, 115, 11-15, 1996.
9. **Mueller M.M., Ryl E.B., Fenton T., Clandinin D.R.:** Cultivar and growing location differences on the sinapine content of rapeseed. *Can. J. Anim. Sci.*, 58, 579-583, 1973.
10. **Raboy V.:** Seeds for a better future: "low phytate" grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trens in Plant Sciences*, 6(10), 458-462, 2001.
11. **Raybould A.F., Moyes C.L.:** The ecological genetics of aliphatic glucosinolates. *Heredity*, 87, 383-391, 2001.

12. **Renard M., Bernard C., Deschamps M., Furtoss V., Lila M., Quinsac A., Regnier J.M., Ribaillier D.:** Glucosinolate analysis in whole rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. In: J.-P. Wathelet (ed.), *Glucosinolates in Rapeseed: Analytical Aspects*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 173-176, 1987.
13. **Röbbelen G.:** Mutation breeding for quality improvement. A case study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review*, n^o6. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Viena, Austria, 1990.
14. **Röbbelen G.:** Status and aspects of rapeseed breeding. (Proc. Advisory Group Meeting, Viena), 103-117, 1982.
15. **Spasibonek S., Byczyńska B., Krzymański J.:** Badania nad optymalizacją warunków mutagenyzy chemicznej u rzepaku w celu otrzymania nowej zmienności nienasyconych kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste*, XX, 613-621, 1999.
16. **Syed A.S., Ali I., Rahman K.:** Improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) for agronomic and quality characters through induced mutations and hybridization. Proc. of a Final Research Co-ordination of an FAO/IAEA, Vienna, 11-15, 1993.
17. **Thies W.:** Schnelle und einfache Analysen der Fettsäurezusammensetzung in einzelnen Raps-Kotyledonen I. Gaschromatografische und Papierchromatografische Methoden. *Z. Pflanzenzüchtg.* 65, 181-202, 1971.
18. **Thies W.:** Isolation of sinigrin and glucotrapaeolin from cruciferous seeds. *Fat Sci. Techn.* 90, 311-314, 1988.
19. **Thies W.:** Determination of the phytic acid and sinapic acid esters in seeds of rapeseed and selection of genotypes with reduced concentration of these compounds. *Fat Sci. Techn.* 93, 49-52, 1991.
20. **Velasco L., Becker H.C.:** Estimation the fatty acid composition of the oil in intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, 101, 221-230, 1998.
21. **Velasco L., Becker H.C.:** Analysis of total glucosinolate content and individual glucosinolates in *Brassica* ssp. by near-infrared reflectance spectroscopy. *Plant Breeding*, 117, 97-102, 1998.
22. **Velasco L., Fernandez-Martinez J., De Haro A.:** Screening Ethiopian mustard for erucic acid by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.*, 36, 1068-1071, 1996.
23. **Velasco L., Fernandez-Martinez J., Del Rio M., De Haro A.:** The applicability of NIRS for estimatig multiple seed quality components in Ethiopian mustard. In: GCIRC (Ed.), *Proc 9th Int Rapeseed Congr*, Cambridge, UK, 867-869, 1995.
24. **Velasco L., Möllers C.:** Nondestructive assessment of sinapine acid esters in *Brassica* species: II. Evaluation germplasm and identification fenotype with reduce level. *Crop Sci.*, 38, 1650-1654, 1998.
25. **Velasco L., Möllers C.:** Nondestructive assesment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, 123, 89-93, 2002.
26. **Wojciechowski A., Kott L., Beversdorf W.:** Zwartość sinapiny w haploidalnych zarodkach rzepaku (*Brassica napus*) otrzymanych w kulturach izolowanych mikrospor. *Rośliny Oleiste*, XV, 105-110, 1994.
27. **Wojciechowski A., Olejniczak J.:** Możliwości modyfikacji składu kwasów tłuszczowych u rzepaku. *Hodowla Roślin, Materiały I Krajowej Konferencji*, Poznań, 19-20.11, 339-344, 1997.

POSSIBILITIES OF USING OF NEAR-INFRARED REFLECTANCE
SPECTROSCOPY (NIRS) FOR ANALYZES OF QUANTITATIVE
AND QUALITATIVE TRAITS IN SEEDS OF WINTER OILSEED RAPE
(*BRASSICA NAPUS* L.)

*J. Olejniczak*¹, *A. Wojciechowski*², *T. Zum Felde*³, *C. Mollers*³

¹Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
e-mail: jole@igr.poznan.pl

²Department of Genetics and Plant Breeding, University of Agriculture
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań
e-mail: ajwoj@au.poznan.pl

³Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Geor-August-Universität
Von-Siebold-Str. 8, D-37075 Göttingen, Germany

Abstract. The aim of presented paper was to evaluate the possibility of using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) as a rapid and non-destructive method to estimate the fatty acid, sinapine, glucosinolates and phytic acid content in intact seeds of oilseed rape. Generally, 6552 mutants of M₄ generation of winter oilseed rape using NIR spectroscopy were analysed. The content of oil varied from 23,1 to 54,6%, protein from 15,1-32,0%, glucosinolates from 0,2-140,6 μM g⁻¹, sinapine from 0,36-1,71%, and phytic acid from 9,9-14,4%. The variability of investigated traits was much higher in mutants compare to the control line DH-0120. In a few chosen mutants the additional analyses with applying HPLC and GLC were done. The aim of these analyses was to evaluate the credibility of results obtained by using NIRS method. In investigated seeds the highest diversity has been found in the fatty acids composition.

Key words: NIRS, rapeseed, sinapine, glucosinolates, fatty acids.