

Michał Starzycki, Eligia Starzycka, Krystyna Czernik-Kołodziej  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

**Skład kwasów tłuszczowych  
w liściach i korzeniach mieszańców  
*Brassica oleraceae* ssp. × *Brassica napus*  
oraz rzepaku rosnących w warunkach  
in vitro oraz in vivo**

**Fatty acids composition in leaves and roots  
of *Brassica oleracea* × *Brassica napus* hybrids and of oilseed rape grown  
in in vitro and in vivo conditions**

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, mieszańce międzygatunkowe, hodowla in vivo i in vitro, kwasy tłuszczowe

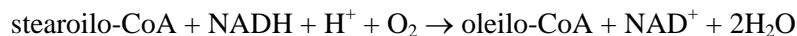
Key words: winter rapeseed, interspecies hybrids, in vivo and in vitro breeding, fatty acids

Do badań wykorzystano mieszańce międzygatunkowe pokolenia pierwszego F<sub>1</sub>: kapusta (pastewna, jarmuż, brukselka, forma żółtonasienna) × rzepak. Rośliny rzepaku ozimego reprezentowane były przez trzy odmiany: Bor, Kana, Lirajet. Zarówno rzepak jak i mieszańce międzygatunkowe rosły na płytkach Petriego przy dwunastogodzinnym fotoperiodzie. Te same rozklonowane rośliny hodowano w warunkach szklarniowych w doniczkach, także przy dwunastogodzinnym fotoperiodzie. Część eksplantatów form żółtonasiennych z kombinacji: żółtonasienna kapusta × żółtonasienny rzepak ukorzeniono w kulturach hydroponicznych. Do analizy kwasów tłuszczowych pobierano 3 najmłodsze liście z głównego pędu rośliny z każdej kombinacji. Wykazano różnice w procentowej zawartości kwasów tłuszczowych pomiędzy różnymi częściami anatomicznymi roślin rosnących w warunkach in vitro i in vivo. Dla tych samych klonowanych eksplantatów udział kwasu oleinowego był znacznie niższy u roślin pochodzących z warunków in vivo w stosunku do udziału tego samego kwasu analizowanego z warunków in vitro.

The first generation (F<sub>1</sub>) of interspecies hybrids (forage cabbage, curly kale, brussels sprouts, yellow-seed forms) × rapeseed were used for the investigations. Three winter rapeseed cultivars: Bor, Kana, and Lirajet were used. Both interspecies hybrids and checks grew on Petri dishes at 12-hour photoperiod. A part of explants of yellow-seed forms from yellow-seed cabbage × yellow-seed rapeseed combination were rooted by hydroponic culture. The youngest 3 leaves from the main stem of each combination were taken for fatty acids analysis. It was observed that there are differences in fatty acid content among different parts of plants grown in vitro and in vivo conditions. For the explants from the same clones oleic acid content was substantially lower in plants from in vivo conditions.

## Wstęp

U organizmów eukariotycznych głównym substratem do syntezy kwasów tłuszczowych jest palmitynian, a same kwasy powstają w reakcji elongacji na cytozolowej powierzchni retikulum endoplazmatycznego. W błonach retikulum endoplazmatycznego (mikrosomach) dwuwęgłowe jednostki dołączają się kolejno do końca karboksylowych kwasów nasyconych jak i nienasyconych. W układach mikrosomowych w długich łańcuchach acetylo-CoA tworzą się wiązania podwójne.



Przedstawiona reakcja jest katalizowana przez trzy enzymy związane z błoną: reduktazy cytochromu  $b_5$  zależnej od NADH, cytochromu  $b_5$  i desaturazy. Literatura na podany temat jest obszerna i obejmuje wiele znaczących dla biochemii pozycji (Heinz 1993, Harwood 1980, Harwood 1996, Holloway 1983, Jaworski 1974, Murata i in. 1992, Murata i Wada 1995, Shanklin i Cahoon 1998, Stumpf 1980). Organizmy zwierzęce nie posiadają enzymów zdolnych do tworzenia kwasów tłuszczowych w łańcuchach wiązań podwójnych w położeniu dalszym niż przy węglu C-9. Kwasy, takie jak linolowy i linolenowy są niezbędne dla ssaków i jako egzogenne, bez możliwości syntezy w organizmie, muszą być dostarczone w pożywieniu roślinnym. Są one prekursorami syntezy innych kwasów, np. arachidonianu  $C_{20:4}$ , który z kolei jest prekursorem hormonów ikozanoidowych.

W niniejszej pracy przedstawiono wstępne badania mające na celu oszacowanie różnic w poziomie kwasów tłuszczowych w roślinach *B. napus* oraz u mieszańców oddalonych z rodziny *Brassicaceae* K., hodowanych w warunkach in vitro i in vivo. Otrzymane wyniki stanowią cenną informację, przydatną przy dalszych pracach związanych z transformacją genu desaturazy do rzepaku.

## Materiały i metody

Do badań wykorzystano mieszańce międzygatunkowe pokolenia pierwszego  $F_1$  z kombinacji: kapusta pastewna  $\times$  rzepak „00”, kapusta jarmuż  $\times$  rzepak „00”, kapusta brukselska  $\times$  rzepak „00” oraz żółtonasienna kapusta  $\times$  żółtonasienny rzepak. Rośliny *B. napus* reprezentowane były przez trzy odmiany: Bor, Kana, Lirajet. Zarówno rzepak, jak i mieszańce międzygatunkowe rosły na płytkach Petriego w ciągu trzech tygodni, w pokoju hodowlanym o dwunastogodzinnym fotoperiodzie i stałej temperaturze 17°C. Te same rozklonowane rośliny hodowano w warunkach szklarniowych w doniczkach, przy dwunastogodzinnym fotoperiodzie i średniej temperaturze 18°C także w ciągu 3 tygodni. Część eksplantatów form żółtonasiennych z kombinacji: żółtonasienna kapusta  $\times$  żółtonasienny rzepak ukorzeniono w kulturach hydroponicznych. Do analizy kwasów tłuszczowych pobierano trzy najmłodsze liście z głównego pędu każdej kombinacji (o godzinie

10<sup>00</sup>). Z niektórych roślin hodowanych in vitro do analiz pobrano korzenie (2 gramy) uprzednio podsuszone na bibule.

Po ekstrakcji oleju i estryfikacji, analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych wykonano za pomocą chromatografu gazowego Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890, używając 30 m kolumny kapilarnej (RTX-225) i wodoru jako gazu nośnego. Ogółem wykonano 140 analiz składu kwasów tłuszczowych (w tym 20 analiz korzeni z hodowli in vitro). Do obliczeń statystycznych zastosowano test t-Studenta.

## Wyniki

Wyniki przedstawiono w formie tabel i chromatogramu. Wykazano różnice w składzie kwasów tłuszczowych dla roślin rosnących w warunkach in vitro i in vivo (tab. 1). Dla tych samych rozklonowanych eksplantatów udział kwasu oleinowego był znacznie niższy u roślin pochodzących z warunków in vivo w stosunku do udziału tego samego kwasu analizowanego z warunków in vitro (rys. 1, tab. 2). Jedyny wyjątek stanowiła kombinacja F<sub>1</sub> kapusta pasterna × rzepak, w której odnotowano niższy udział kwasu oleinowego (tab. 2) we wszystkich analizowanych próbach tego typu. Udział tego kwasu w korzeniach klonowanych eksplantatów był znacznie wyższy niż w liściach. Odwrotną sytuację obserwowano dla kwasu linolenowego. W żadnej z badanych prób nie stwierdzono obecności kwasu erukowego.

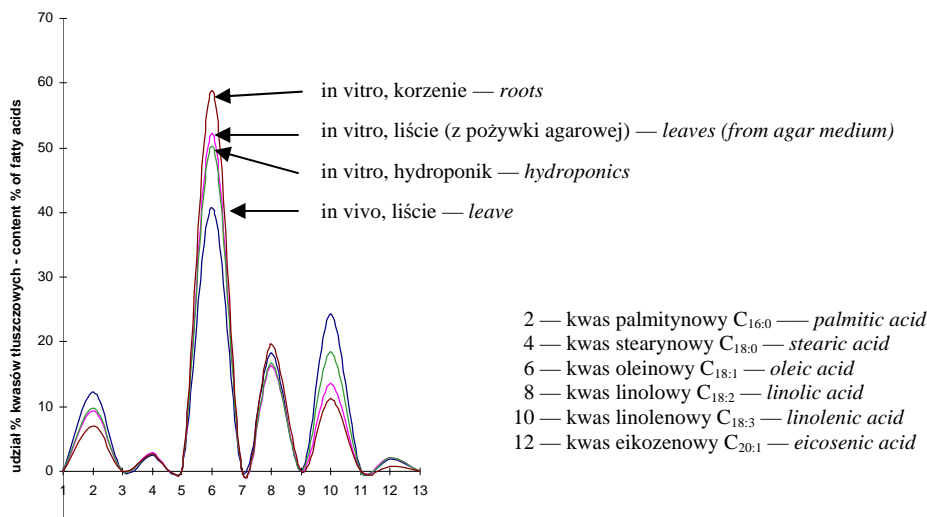
Tabela 1  
Prawdopodobieństwo obliczone testem t-Studenta zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w liściach roślin hodowanych w warunkach in vivo i in vitro — *The t-Student test of the content of fatty acids in leaves of plants breed in in vitro and in vivo conditions*

Kwasy tłuszczowe <i>Fatty acids</i>	Średnie wartości z analiz <i>Values average from analyses</i>		Prawdopodobieństwo testu t-Studenta <i>Probability Test T</i>
Palmitynowy — <i>Palmitic</i> C <sub>16:0</sub>	in vivo	10,4	0,4134
	in vitro	9,5	
Stearynowy — <i>Stearic</i> C <sub>18:0</sub>	in vivo	1,9	0,0003
	in vitro	2,9	
Oleinowy — <i>Oleic</i> C <sub>18:1</sub>	in vivo	46,1	0,0380
	in vitro	54,3	
Linolowy — <i>Linolic</i> C <sub>18:2</sub>	in vivo	16,8	0,8978
	in vitro	16,7	
Linolenowy — <i>Linolenic</i> C <sub>18:3</sub>	in vivo	19,4	0,0111
	in vitro	12,3	
Eikozenowy — <i>Eicosenic</i> C <sub>20:1</sub>	in vivo	1,7	0,0906
	in vitro	2,1	

Tabela 2

Skład kwasów tłuszczowych [%] — *Fatty acid composition*

Analiza z hodowli <i>Analysis of fatty acids from</i>	Kwasy tłuszczowe — <i>Fatty acids</i>					
	C <sub>16:0</sub> palmitynowy <i>palmitic</i>	C <sub>18:0</sub> stearynowy <i>stearic</i>	C <sub>18:1</sub> oleinowy <i>oleic</i>	C <sub>18:2</sub> linolowy <i>linolic</i>	C <sub>18:3</sub> linolenowy <i>linolenic</i>	C <sub>20:1</sub> eikozenowy <i>eicosenic</i>
Rośliny F <sub>1</sub> — mieszańce międzygatunkowe z kombinacji kapusta pastewna × rzepak <i>F<sub>1</sub> plants from combination forage cabbage × rapeseed</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	8,0	1,2	55,1	16,8	15,8	2,2
In vitro — liście — <i>leaves</i>	11,2	2,6	39,7	18,2	27,4	1,1
In vitro — korzenie — <i>roots</i>	6,6	2,2	61,3	19,8	9,2	1,4
Rośliny F <sub>1</sub> — mieszańce międzygatunkowe z kombinacji kapusta jarmuż × rzepak <i>F<sub>1</sub> plants from combination curly kale × rapeseed</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	9,2	2,0	46,2	18,2	23,7	1,8
In vitro — liście — <i>leaves</i>	7,9	2,8	55,2	18,4	14,3	1,5
In vitro — korzenie — <i>roots</i>	6,4	2,1	59,2	19,7	11,1	1,5
Rośliny F <sub>1</sub> — mieszańce międzygatunkowe z kombinacji kapusta brukselska × rzepak <i>F<sub>1</sub> plants from combination brussels sprouts × rapeseed</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	12,4	2,4	41,8	12,9	28,0	2,4
In vitro — liście — <i>leaves</i>	11,3	3,0	56,2	14,1	8,3	0,8
In vitro — korzenie — <i>roots</i>	5,8	2,1	61,2	20,4	10,5	–
Rośliny odmiany Bor — <i>Plants from Bor variety</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	11,8	2,2	38,5	17,3	28,4	1,7
In vitro — liście — <i>leaves</i>	10,5	3,1	57,3	18,4	18,8	2,3
In vitro — korzenie — <i>roots</i>	6,2	2,3	60,4	20,0	9,2	1,9
Rośliny odmiany Lirajet — <i>Plants from Lirajet variety</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	9,7	2,2	54,6	14,9	16,4	2,1
In vitro — liście — <i>leaves</i>	7,7	3,0	57,5	18,7	11,7	1,4
Rośliny odmiany Kana — <i>Plants from Kana variety</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	9,2	1,3	45,6	19,3	22,9	1,6
In vitro — liście — <i>leaves</i>	8,6	3,0	60,7	13,5	6,3	7,0
Rośliny F <sub>1</sub> — mieszańce międzygatunkowe kapusta żółtonasienna × rzepak żółtonasienny <i>F<sub>1</sub> plants from combination yellow-seed cabbage × yellow-seed rapeseed</i>						
In vivo — liście — <i>leaves</i>	12,3	2,5	40,7	18,3	24,4	1,9
In vitro — liście — <i>leaves</i>	9,4	2,9	52,3	16,4	13,6	2,1
In vitro — korzenie — <i>roots</i>	6,9	2,6	58,9	19,6	11,3	0,7
Hydroponik — liście <i>Leaves — hydroponic</i>	9,8	2,7	50,3	16,7	18,4	2,1



Rys. 1. Komputerowe chromatogramy jednostkowe kwasów tłuszczowych (średni udział analizowanych prób) — *Individual computer chromatogram of fatty acids (average from analyzed samples)*

## Dyskusja

Analizy kwasów tłuszczowych wykonano na bardzo zróżnicowanym materiale. Do badań wykorzystano eksplantaty (liście, korzenie) pochodzące z roślin uzyskanych na drodze krzyżowań międzygatunkowych, a także eksplantaty z roślin rzepaku trzech różnych odmian: Kana, Bor i Lirajet. Reakcja podwyższenia lub obniżenia poziomu kwasu oleinowego w analizowanych tkankach nie zależała od rodzaju użytych kombinacji krzyżówkowych czy odmiany rzepaku, lecz tylko od warunków w jakich prowadzono hodowlę (in vitro — wysoka zawartość kwasu oleinowego, in vivo — niższa zawartość kwasu oleinowego) (tab. 2). Tylko w dla mieszańców międzygatunkowych z kombinacji kapusta pastewna × rzepak obserwowano odwrotną zależność, przyczyna tego zjawiska nie została przez nas wyjaśniona. Wielu autorów (Spasibionek i in. 1999, Pleines i Fredt 1988, Doeng i Scarth 1998) wykazało, że za poziom poszczególnych kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku w dużej mierze odpowiedzialny jest przebieg pogody. Przy gorszym nasłonecznieniu desaturacja do kwasu oleinowego jest słabsza i synteza jego jest mniejsza, co z kolei powoduje wzrost syntezy kwasu linolowego. W naszych badaniach (na liściach) odnotowano nową zależność podaną powyżej.

Otrzymane wyniki są pierwszą informacją na podany temat. Wykonane badania dały odpowiedź w jaki sposób należy postępować z roślinami z rodziny *Brassicaceae* K. tak, aby następnie metodami chromatografii gazowej określić poziom kwasów tłuszczowych w tkankach i odróżnić formy zmodyfikowane genetycznie (gen desaturazy  $\Delta^9$ ) od form wyjściowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że do badań kwasu oleinowego w liściach rzepaku

korzystniej jest pobierać eksplantaty pochodzące z warunkach *in vivo*. Bowiem w takich tkankach po modyfikacjach genetycznych, wzrost zawartości kwasu oleinowego (od około 43%) będzie bardziej widoczny, niż z tkanek hodowanych w warunkach *in vitro* (60%, rys. 1).

## Podsumowanie

---

- Stwierdzono statystycznie istotne różnice zawartości kwasów tłuszczowych w roślinach hodowanych w warunkach *in vitro* i *in vivo*, bez względu na pochodzenie genetyczne analizowanego materiału (mieszance międzygatunkowe lub rzepak).
- Aby modyfikacje kwasów tłuszczowych w roślinach były widoczne, do dalszych prac należy użyć materiału pochodzącego z warunków *in vivo*.
- Wykonane badania zostaną wykorzystane w pracach nad modyfikacjami genetycznymi rzepaku przy pomocy *A. tumefaciens* i plazmidowego genu kodującego desaturazę.

## Literatura

---

- Doeng X, Scarth R. 1998. Temperature effects on fatty acid composition during development of low linolenic oilseed rape (*Brassica napus*). *JAACS* 75 (7): 759-766.
- Harwood J.L. 1980. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. *The Biochemistry of Plants*, ed. P.K. Stumpf, Conn E.E., Academic Press, New York, vol. 4: 1-55.
- Harwood J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1301: 7-76.
- Heinz E. 1993. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipid Metabolism in Plants*, ed. T.S. Moore, Boca Raton, FL: CRC Press, 34-89.
- Holloway P.W. 1983. Fatty acid desaturation. *The Enzymes*, ed. P.D. Boyer, Academic Press, Orlando, FL, vol. XVI, 63-83.
- Jaworski J.G., Stumpf P.K. 1974. Fat metabolism in higher plants. Properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctorius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 162: 158-165.
- Murata N., Wada H., Gombos Z. 1992. Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 33: 933-941.
- Murata N., Wada H. 1995. Acyl-lipid desaturase and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308: 1-8.
- Pleines S., Friedt W. 1988. Breeding for improved C18-fatty acid composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fat Sci. Technol.* 90 (5): 167-171.
- Shanklin J., Cahoon E.B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611-641.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1999. Badania nad optymalizacją warunków mutagenyzy chemicznej u rzepaku w celu otrzymania nowej zmienności nienasyconych kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste XX* (2): 613-621.
- Stumpf P.K. 1980. Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids. *The Biochemistry of Plants*, ed. P.K. Stumpf, Conn E.E., Academic Press, New York, vol. 4: 177-204.