

Krzysztof Michalski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

Changes of fatty acid composition in seed oil of rapeseed during first 96 hours of germination

Zmiany składu kwasów tłuszczowych oleju w nasionach rzepaku w pierwszych 96 godzinach kiełkowania

Key words: fatty acids analysis, FAME, half-seed selection, rapeseed, *Brassica napus* L.

Quite frequently during breeding works is applied so called half-seed analysis for individual selection. A single seed is first swelling for some time on wet filtering paper, then embryo is excised and divided into two parts (half-seed method) The cotyledon with germ is grown to the full plant, where another cotyledon is used for chromatographic analysis of fatty acid composition. The objective of the present research was to determine how long the original composition of fatty acid remains unchanged. For research purposes were selected four different lines: DH-4, DH-5, mutants: M-61, 464 and one variety (Kana) of rapeseed as reference. One batch was containing 24 seeds — compromise between technical opportunities and elimination of natural variance. Samples were germinated in an incubator during 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 and 96 h, then prepared manually. The cotyledon not containing a germ was used for fatty acids composition analysis by gas chromatography (Agilent 5890, FID detector, Chemstation software, DB-23 column 200°C, isothermal with hydrogen as carrier gas). Obtained chemical data for each combination were averaged and analysis of variance was performed. During the first 48 h there were not observed any significant changes in fatty acid composition. Fatty acid composition in samples incubated longer than 48 h could not be representative for dry seed fatty acid composition.

The changes in fatty acid content after 48 h depended on variety/line. Mutants showed different behavior as compared to natural varieties.

Słowa kluczowe: analiza skład kwasów tłuszczowych, selekcja metoda połówkowa rzepak

W pracach hodowlanych wykorzystuje się metodę analizy chemicznej połówek nasion dla przeprowadzania wczesnej selekcji indywidualnej genotypów w hodowli nowych, ulepszonych pod względem składu chemicznego odmian. Nasiona układa się na wilgotnej bibule i poddaje pęcznieniu przed wypreparowaniem zarodka, z którego następnie odcina się jeden liścień do przeprowadzenia analizy, a z pozostałej części hoduje się roślinę i otrzymuje nowe nasiona. Celem pracy było zbadanie jak długo w procesie pęcznienia i kiełkowania pozostaje niezmienny skład kwasów tłuszczowych oleju. Do badań wybrano cztery linie (dwa mutanty: wysoko oleinowy M-61 i nisko linolenowy 464, dwie linie DH-4 i DH-5) oraz odmianę rzepaku Kana. Dla każdego obiektu przebadano po 24 nasiona aby zminimalizować naturalną zmienność. Próby do analiz chromatograficznych składu kwasów tłuszczowych pobierano po 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 i 96 godzinach kiełkowania. Dla wszystkich kombinacji obliczano średnią i przeprowadzano analizę wariancji. Najbardziej widoczne zmiany obserwowano dla kwasu oleinowego, dominującego wśród pozostałych kwasów. Odmiana Kana oraz linie DH zachowywały się podobnie, a zawartość kwasu oleinowego wzrastała w miarę kiełkowania,

przy czym przez pierwsze 48 godzin nie obserwowano istotnych zmian. Mutanty przez pierwsze 48 godzin były stabilne pod względem składu kwasów tłuszczowych, po czym skład ten zmieniał się w sposób trudny do przewidzenia. Na podstawie otrzymanych wyników można przyjąć, iż przez pierwsze 48 godzin kiełkowania skład kwasów tłuszczowych jest podobny do składu w nieskiełkowanych nasionach, po tym okresie należy wyniki traktować z dużą ostrożnością, szczególnie w odniesieniu do roślin mutowanych.

Introduction

Quite frequently during breeding works is applied half-seed method to develop new varieties with improved chemical composition. Single seed is germinating for some time on wet filtering paper, then divided into two parts. The cotyledon containing a germ is grown to the full plant, where another cotyledon is used for chemical analysis of fatty acid composition. Such information is valuable for breeders, although when the seeds are swelling and germinating, there is the risk that results of the analysis of fatty acid composition cannot be representative for dry seed fatty acid composition due to cell processes using single fatty acids as a driving force for growth and life functions. The objective of the present research was to determine how long the original compositions of fatty acid remains unchanged and analysis results are still representative as compare to analysis results of untouched seed.

The half-seed method is rather widely used in many different kinds of oilseed species like sunflower (Fernández-Moya 2003), linseed (Nichterlein 1988) and rapeseed (Kondra et al. 1978). Similar work, concerning the same objective, was published by Krzymański (1971). This work is in some way a continuation of it, but due to time lag and different breeding material the behavior of contemporary materials can differ from those used by Krzymański (1971).

Materials and methods

For research purposes four different lines of rapeseed and one variety as reference were chosen. The reference was a well established Polish variety Kana, where other samples consisted of two mutants (high oleic acid M-61 and low linolenic acid 464) and two lines DH-4 and DH-5 from IHAR materials. Samples were grouped in the batches, each containing 24 seeds for each germination period, which is a compromise between technical possibility and the need to eliminate the natural variance. The seeds were placed on wet filtering paper and kept in the incubator at 25°C to commence swelling and germination. After subsequent 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 84 and 96 h samples were removed from incubator and transferred into scintillation vials, one half-seed per vial. Every vial was filled with 2 ml of hexane and stainless steel rod was inserted. Then vials were sealed and put

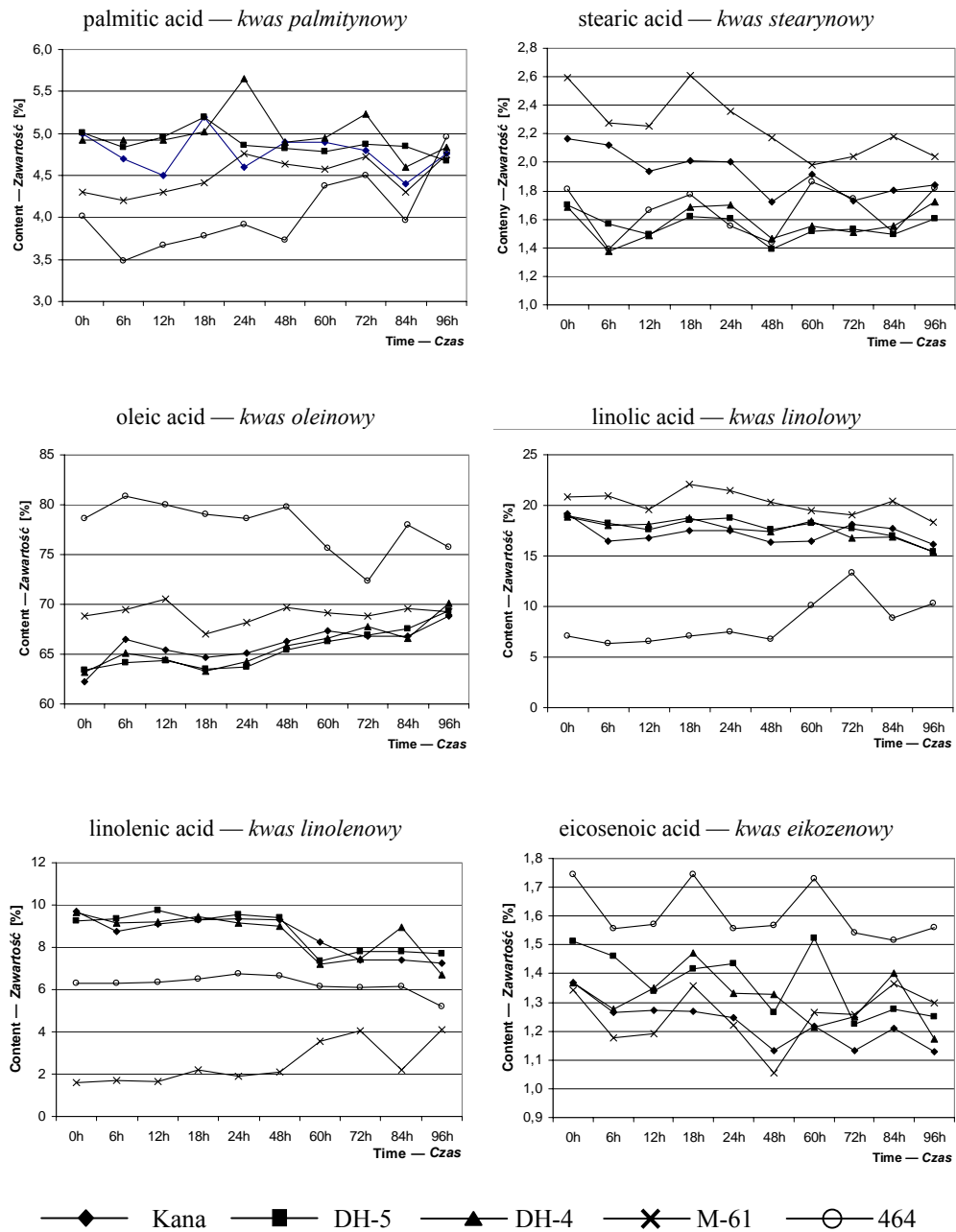


Fig. 1. Changes in fatty acid amount during first 96 hours of germination — *Zmiany zawartości kwasów tłuszczowych podczas pierwszych 96 godzin kiełkowania*

Table 1

Two way variance analysis for individual fatty acids — *Dwuczynnikowa analiza wariancji dla poszczególnych kwasów tłuszczowych*

Source of variance <i>Źródło wariancji</i>	SS	df	MS	F	p-value	Test F
Palmitic acid — <i>Kwas palmitynowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	74,29	4	18,57	53,70	1,07E ⁻³⁸	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	13,96	9	1,55	4,48	1,02E ⁻⁰⁵	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	43,47	36	1,21	3,49	1,52E ⁻¹⁰	1,44
Error — <i>Błąd</i>	207,50	600	0,35			
Total — <i>Ogółem</i>	339,23	649				
Stearic acid — <i>Kwas stearynowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	44,36	4	11,09	92,53	2,87E ⁻⁶¹	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	9,13	9	1,01	8,46	5,8E ⁻¹²	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	7,98	36	0,22	1,85	0,002196	1,44
Error — <i>Błąd</i>	71,91	600	0,12			
Total — <i>Ogółem</i>	133,38	649				
Oleic acid — <i>Kwas oleinowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	13602,35	4	3400,59	597,67	1,2E ⁻²⁰⁷	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	617,74	9	68,64	12,06	1,33E ⁻¹⁷	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	1605,93	36	44,61	7,84	1,53E ⁻³¹	1,44
Error — <i>Błąd</i>	3413,82	600	5,69			
Total — <i>Ogółem</i>	19239,85	649				
Linolic acid — <i>Kwas linolowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	10613,53	4	2653,38	691,54	5E ⁻²²³	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	230,89	9	25,65	6,69	3,75E ⁻⁰⁹	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	929,12	36	25,81	6,73	2,94E ⁻²⁶	1,44
Error — <i>Błąd</i>	2302,13	600	3,84			
Total — <i>Ogółem</i>	14075,67	649				
Linolenic acid — <i>Kwas linolenowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	3580,35	4	895,09	1117,42	2,4E ⁻²⁷⁶	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	111,20	9	12,36	15,42	9,57E ⁻²³	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	349,30	36	9,70	12,11	1,79E ⁻⁵⁰	1,44
Error — <i>Błąd</i>	480,62	600	0,80			
Total — <i>Ogółem</i>	4521,47	649				
Eicosenoic acid — <i>Kwas eikozenowy</i>						
Lines/varietyes — <i>Linie/odmiany</i>	11,92	4	2,98	69,46	2,52E ⁻⁴⁸	2,39
Time of growing — <i>Czas wzrostu</i>	2,81	9	0,31	7,27	4,46E ⁻¹⁰	1,90
Interaction — <i>Interakcja</i>	2,94	36	0,08	1,90	0,001393	1,44
Error — <i>Błąd</i>	25,74	600	0,04			
Total — <i>Ogółem</i>	43,42	649				

into shaker, whose shake speed was tuned to make possible grinding a sample by metal rod bumping on the top and bottom of the vial. Such method of grinding ensures excellent pulverization and maximum extraction with minimal losses of oil. After 15 minutes of grinding and then centrifugation, the hexane solution was transferred into glass vial, where estrification was conducted by standard method, applied for regular samples (Byczyńska, Krzymański 1969). The obtained esters were analyzed by gas chromatography on Agilent 6890 chromatograph with FID detector and Chemstation software. The DB-23 capillary column working at 200°C (injector and detector temperature was set to 220°C), with hydrogen as gas carrier was applied. Obtained chemical data for each batch were averaged to remove natural variance. Obtained results for every individual fatty acid are shown below in graphical form (Fig. 1) and natural variance calculated as averaged standard deviation of single batches was shown in Fig. 2. The two way analysis of variance was calculated. Obtained results are presented in Table 1.

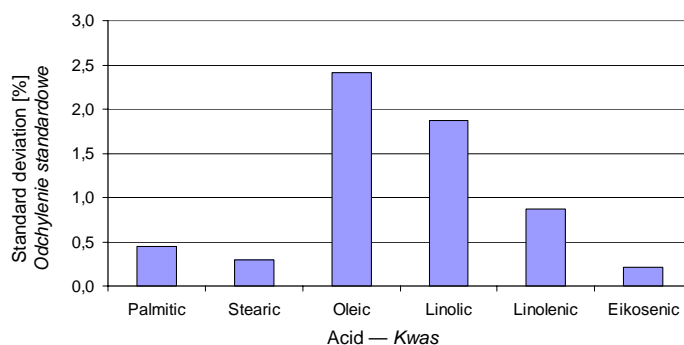


Fig. 2. Average standard deviation between subsamples for individual fatty acids — *Uśrednione odchylenie standardowe pomiędzy podpróbkami dla poszczególnych kwasów tłuszczowych*

Conclusions

- Investigated genotypes differ significantly in respect to fatty acid composition in seed oil.
- Changes in fatty acid composition during seed swelling and germination were also significant.
- Interaction genotypes-germination time was significant, so changes in fatty acid composition during germination depend on genotypes. The most different reaction was observed with mutants as compared with standard variety Kana.

- Changes which occurred during 48 hours of germination were practically insignificant.
- The changes in fatty acid contents after 48 h were dependent on variety or line.
- Behavior of mutants differed from this of natural varieties or lines. Mutants were more variable during germination process.

References

- Krzymański J. 1971. Zmiany składu kwasów tłuszczowych w czasie kiełkowania nasion rzepaku. *Biuletyn IHAR*, 55-56.
- Krzymański J., Byczyńska B. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne*, 2: 108-114.
- Krzymański J. 1965. Modyfikacje metody ilościowego oznaczania kwasów tłuszczowych w olejach roślinnych za pomocą chromatografii bibułowej. *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 9 (4): 423-429.
- Fernández-Moya V., Martínez-Force E., Garcés R. 2003. Temperature-related non-homogeneous fatty acid desaturation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Biomedical and Life Sciences*, 216, 5: 834-840.
- Nichterlein K., Marquard R., Friedt W. 1988. Breeding for Modified Fatty Acid Composition by Induced Mutations in Linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Breeding*, 101, 3: 190.
- Kondra Z.P., Thomas P.M. 1978. Comparison of heritabilities derived from single F₂ seed populations and bulk seed from F₂ plant populations for oleic, linoleic and linolenic acids in oilseed rape. *Euphytica*, 27/2: 645-647.