

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 53.

Tytuł zadania: **Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych.**

Kierownik zadania: *dr S. Spasibonek*

#### Cel zadania

Przeprowadzenie szczegółowej analizy badanego materiału roślinnego w odniesieniu do ekspresji cech fenotypowych, decydujących o wartości gospodarczej danego genotypu. Należą do nich zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju nasion, glukozyolanów w śrucie, oraz odporność na stresy abiotyczne i biotyczne.

#### Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiło 58 genotypów obejmujących: 2 linie mutantów typu HO (od 78,6 do 79,5%), 10 rekombinantów typu HO z wysoką zawartością kwasu oleinowego (od 79,3 do 82,2%), 1 linię mutantą typu LL ze znacznie obniżoną zawartością kwasu linolenowego (do 1,5%), 23 rekombinanty typu HOLL (uzyskane w wyniku krzyżowania mutantów typu HO i LL) z wysoką zawartością kwasu oleinowego (od 75,0 do 81,5%) i niską zawartością kwasu linolenowego (od 2,2 do 4,5%), 10 rekombinantów o wysokiej zawartości tłuszczu (od 49,2 do 50,9%), 12 rekombinantów o ekstremalnie niskiej zawartości sumy glukozyolanów alkenowych (od 0,2 do 0,9  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion).

W trakcie wegetacji w szkółkach hodowlanych linie mutantów i rekombinantów rzepaku oceniano pod względem głównych cech agronomicznych: stan roślin po zimie (bonitacja przezimowania, skala 1–9 stopni), początek kwitnienia (liczba dni od 01.01.2014), długość kwitnienia (liczba dni od 01.01.2014), wyleganie (skala 1-9<sup>0</sup>). Na podstawie obserwacji cech związanych z morfologią roślin mutantów oraz rekombinantów (pokrój rośliny, intensywność kwitnienia) przeprowadzono selekcję roślin w wyniku której wykonano izolację roślin przed obcozapyleniem. Z tych roślin do krzyżowań w szklarni wybrano po 10 najlepszych genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych 18-węglowych jedno- i wielonienasyconych, wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozyolanów alkenowych. Nasiona wybranych genotypów wysiewano do doniczek. Rośliny w fazie pięciu liści poddano jarowizacji przez okres sześciu tygodni. Dalszy wzrost roślin i prowadzenie krzyżowań przebiega w warunkach szklarniowych. Ponadto do badań wybrano 25 genotypów o zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych, tłuszczu i glukozyolanów alkenowych. Doświadczenia założono metodą bloków losowanych w czterech powtórzeniach, w dwóch Stacjach Hodowli Roślin: Borowo „Spółka Hodowli Roślin Strzelce” i Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice”. Jesienią przeprowadzono następujące pomiary i obserwacje: bonitacja wschodów (skala 1-9), bonitacja stanu roślin jesienią (skala 1-9), pomiar zawartości chlorofilu w liściach przy użyciu chlorometru N tester SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development), liczenie roślin na każdym poletku na powierzchni 3m<sup>2</sup>.

Rekombinanty typu HOLL oraz ich formy rodzicielskie monitorowano pod kątem występowania niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3*. W tym celu genomowy DNA wyizolowano z młodych liści linii mutantów typu HO z wysoką zawartością kwasu oleinowego, linii mutantą typu LL ze znacznie obniżoną zawartością kwasu linolenowego oraz z rekombinantów typu HOLL (uzyskane w wyniku krzyżowania mutantów typu HO i LL) metodą ekstrakcji buforem z CTAB według Doyle'a. Następnie przeprowadzono analizy molekularne za pomocą specyficznych markerów funkcjonalnych: CAPS - dla alleli genu desaturazy *FAD2* w genomie *A. B. napus* oraz SNP dla alleli genów desaturazy *FAD3* w genomach *A* i *C. B. napus*. Do przeprowadzenia testów na obecność zmutowanych alleli genu *BnaA.FAD2*, związanych z wystąpieniem cechy podwyższonej zawartości kwasu oleinowego w nasionach rzepaku, wykorzystano procedurę opracowaną już w poprzednich latach. W bieżącym roku wykorzystywano uproszczoną wersję metody bez dodatkowego oczyszczania DNA przed etapem trawienia enzymem restrykcyjnym. Dla wyizolowanego DNA rzepaku wykonywano PCR ze starterami H3H4CON1 i H3H4CON2 w celu amplifikacji odcinka DNA o długości 732 pz, stanowiącego fragment badanego genu. Amplifikowany fragment DNA poddawano następnie reakcji trawienia przy użyciu enzymu restrykcyjnego *FspBI* (Thermo Scientific), rozpoznającego sekwencję 5'-C↓TAG-3'. Zarówno produkty amplifikacji jak i produkty reakcji trawienia rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym, wybarwiano bromkiem etydydy i obserwowano w świetle UV. Występowanie form allelicznych

genów *fad3* monitorowano z zastosowaniem allelo-specyficznych markerów metodą SNaPshot (Mikolajczyk i wsp., 2010).

Analizy chemiczne zebranych nasion wykonywano w Laboratorium Biochemicznym IHAR w Poznaniu. Procentową zawartość tłuszczu oznaczano za pomocą szerokopasmowego analizatora magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) firmy Newport Instruments Ltd. Skład kwasów tłuszczowych oznaczano za pomocą chromatografii gazowej estrów metylowych kwasów tłuszczowych - chromatograf firmy Hewlett Packard typ 3390A, Agilent Technologies 6890N Network GC System, a wycenę ilościową chromatogramów wykonywano całkując powierzchnie pod pikami. Metoda ta jest zgodna z polskimi normami PN-EN-ISO 5508: 1996 i PN-ISO 5509: 1996. Zawartość i skład glukozyolanów wykonano również metodą chromatografii gazowej, rozdzielając je w formie pochodnych siliolowych desulfoglukozyolanów (Michalski i in. 1995). W metodzie tej do kalibracji chromatografu zastosowano wzorzec europejski CRM-366 o sumarycznej zawartości glukozyolanów 12,1  $\mu\text{M/g}$  nasion z tolerancją 0,8  $\mu\text{M/g}$  nasion. Wzorzec ten został opracowany przez Community Bureau of Reference-BCR jako uśredniona wartość analiz z ring-testu pomiędzy osiemnastoma laboratoriami.

### Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych stwierdzono duże zróżnicowanie genotypów pod względem przezimowania, wczesności, długości kwitnienia oraz wylegania. Wyodrębniono 9 genotypów dobrze zimujących oraz 8 genotypów wczesnych. Obecnie w pracach hodowlanych, poza wysokim plonowaniem i zmienioną zawartością kwasów tłuszczowych w oleju nasion, dąży się również do uzyskiwania odmian dobrze zimujących, wczesnych, bardziej odpornych na okresy suszy w czasie kwitnienia i podczas dojrzewania nasion. Dla ulepszenia wartości gospodarczej otrzymanych mutantów i rekombinantów o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i obniżonej zawartości kwasu linolowego i linolenowego oraz rekombinantów o wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozyolanów alkenowych, konieczna jest wiedza na temat ekspresji genów tych cech. Określenie wpływu efektów cytoplazmatycznych, genetycznych (jądrowych) matki czy zarodka na zawartość badanych cech, pozwala na odpowiedni wybór kierunku krzyżowania. W tym celu prowadzone są krzyżowania wzajemno-przemienne genotypów z wysoką zawartością kwasu oleinowego i niską zawartością kwasu linolenowego, wysoką zawartością tłuszczu i niską zawartością glukozyolanów alkenowych. Dla dokładniejszej oceny sposobu dziedziczenia kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego oraz tłuszczu i glukozyolanów wybrano do badań genotypy o znacznym zróżnicowaniu tych cech.

Najlepszych 25 genotypów pod względem cech jakościowych i agronomicznych oceniano w dwóch doświadczeniach porównawczych. W trakcie wegetacji jesiennej dokonano ocenę wschodów. Cecha ta istotnie różnicowała badane genotypy. Dokonano pomiaru zawartości chlorofilu w liściach. Cecha ta również istotnie różnicowała badane genotypy. Największe uszkodzenie syntezy chlorofilu zaobserwowano u rekombinanta z genotypem mutantu typu HO 388/1i+6i+7i/14. Największą koncentracją chlorofilu w liściach charakteryzowały się 3 genotypy powyżej 50 jednostek SPAD. Na podstawie oceny stanu roślin przed zimą stwierdzono brak zróżnicowania genotypów pod względem tej cechy. Rozwój roślin przed zimą ze szczególnym uwzględnieniem kondycji i rozwoju rozety przyjmowane są jako kryterium dobrego lub gorszego przygotowania do zimowania. Oceniane genotypy wytworzyły dobrze rozwiniętą rozetę o 7-9 liściach.

Użyte do selekcji markery typu CAPS i SNP umożliwiają jednoznaczną identyfikację zmutowanych form allelicznych genów desaturazy *FAD2* w genomie *A B. napus* i desaturazy *FAD3* w genomach *A* i *C B. napus* odpowiedzialnych za zawartości odpowiednio kwasu oleinowego i linolenowego w oleju nasion linii mutantów i rekombinatów typu HO i HOLL rzepaku ozimego. W obrębie badanych 95 genotypów typu HOLL zidentyfikowano 42 genotypy homozygotyczne typu HOR4 oraz 5 homozygotycznych typu HOR3, 14 form heterozygotycznych typu HOR4 oraz 2 formy heterozygotyczne typu HOR3. Zidentyfikowano 32 formy homozygotyczne typu dzikiego. Analizy na obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach *A* i *C B. napus* wykazały 39 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci (genotyp aacc), 11 genotypów typu dzikiego (AACC) oraz różne formy heterozygotyczne: 15 genotypów AAcc, 10 Aacc, 9 AaCc, 6 AACc, 1 AaCC1, 3 aaCC, 1 aaCC. Na podstawie tych badań wyodrębniono 31 form typu HOLL, w których stwierdzono kumulację zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w genomach *A* i *C B. napus*.

W związku z powszechnym zastosowaniem oleju rzepakowego w różnych działach przemysłu zwiększa się różnorodność pożądanych cech jakościowych, które dyktują nowe cele badawcze. W związku z tym badania koncentrują się na uzyskaniu odmian rzepaku typu HO (ang. *high oleic*) wytwarzających olej o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego C18:1 (ok. 77%) i obniżonej zawartości kwasu linolowego C18:2 (ok. 7%) i kwasu linolenowego C18:3 (ok. 7%). Wysoka zawartość kwasu oleinowego wpływa korzystnie na obniżenie poziomu szkodliwej frakcji cholesterolu LDL a stosunek ilościowy zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) tj. C18:2 ( $\omega$ -6) do zawartości C18:3 ( $\omega$ -3) równy 1:1 jest optymalny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Z otrzymanych, izolowanych 335 pojedynczych roślin typu HO pokoleń F<sub>13</sub>—F<sub>4</sub> do dalszych badań wybrano 110 genotypów charakteryzujących się wzrostem zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 72,0% do 82,1%). Zawartości sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych u badanych rekombinantów wahały się odpowiednio (4,7–30,9  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion) i (0,1–28,1  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion). W analizowanych nasionach zawartość tłuszczu wahała się w granicach od 33,2 do 50,5%.

Drugim ważnym kierunkiem prac jest uzyskanie genotypów typu HOLL (ang. *high oleic low linolenic*) o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (C18:1) do (ok. 75%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (C18:3) do (ok. 3%). Olej z nich wykorzystany na cele spożywcze posiada wyższą termostabilność, co zwiększa jego trwałość w czasie głębokiego smażenia, a także ogranicza tworzenie szkodliwych dla zdrowia izomerów trans podczas procesu utwardzania. Ponadto olej tego typu ze względu na znacznie spowolniony proces oksydacji nadaje się do celów technicznych np. jako komponent biopaliwa. Spośród zebranych 221 izolowanych roślin pokoleń F<sub>8</sub>—F<sub>2</sub> do dalszych badań wybrano grupę 102 rekombinantów typu HOLL wykazujących wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 81,2%) oraz obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do 1,9%). Zawartość tłuszczu w wysianych liniach wynosiła (od 40,6 do 47,6%). Zawartości sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych u badanych rekombinantów wahały się odpowiednio (7,9–17,3  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion) i (3,9–11,2  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion).

W śrucie występuje od 37% do 43% białka pastewnego charakteryzującego się wysoką wartością żywieniową ze względu na korzystny skład aminokwasów. Możliwości wykorzystywania białka, które pozostaje po ekstrakcji lub wyciśnięciu oleju w śrucie bądź wyciekach są limitowane przez związki antyżywniowe - glukozyolany alkenowe występujące w nasionach rzepaku. Stąd konieczne są badania nad formami pozbawionymi zawartości tych związków. Z wyselekcjonowanych izolowanych 236 pojedynczych roślin typu wysokotłuszczowego i niskoglukozyolanowego w pokoleniach F<sub>12</sub>—F<sub>3</sub> do dalszych badań wybrano 98 rekombinantów o wysokiej zawartości tłuszczu (do 53,6%) oraz o niskiej zawartości glukozyolanów alkenowych (do 0,2  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion) i sumy glukozyolanów (do 2,0  $\mu\text{M g}^{-1}$  nasion).

#### Wnioski

Po przeprowadzeniu prac selekcyjnych uzyskano genotypy dobrze zimujące, wczesne i średniowczesne. Formy te wykorzystane będą dla określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych oraz poszerzą zmienność tego gatunku. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych w powiązaniu z obserwacjami fenotypowymi decyduje o znaczącym postępie biologicznym prowadzonych prac badawczych w zakresie identyfikacji form rzepaku o zmienionych profilach kwasów tłuszczowych w oleju nasion.