

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 hab. S. Spasibonek

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Genetyki i Hodowli Jakościowej

ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań, telefon: 61 846 42 20, e-mail sspas@nico.ihar.poznan.pl

Cel badań

Otrzymanie genotypów o pożądanых cechach jakościowych (zróżnicowanej zawartości 18-to węglowych kwasów tłuszczowych jedno- i wielonienasyconych, podwyższonej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozyzolanów) oraz o wysokiej wartości rolniczej. Wybór najlepszych linii do dalszych badań związanych z przeprowadzeniem szczegółowej analizy genetycznej w odniesieniu do ekspresji cech fenotypowych, decydujących o wartości gospodarczej danego genotypu. Ponadto do badań włączono markery genetyczne monitorujące występowanie niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w liniach obejmujących rekombinanty typu HO, LL, HOLL oraz ich formy rodzicielskie.

Zadanie realizowane było w ramach czterech tematów badawczych:

1. Fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych i biochemicznych.
2. Określenie determinacji genetycznej cech jakościowych.
3. Ocena genotypów w doświadczeniach porównawczych.
4. Genotypowanie roślin.

Materiał badawczy

Do badań włączono rekombinanty typu HO (z genem mutantu wysokooleinowego) o wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (71,7%–81,7%), rekombinanty typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (72,1%–82,4%), o obniżonej zawartości kwasu linolenowego (od 2,0%–6,2%) oraz genotypy o wysokiej zawartości tłuszczu (do 49,3%), o ustabilizowanej bardzo niskiej zawartości glukozyzolanów alkenowych (0,2–3,7 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyzolanów (od 2,0–9,7 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Temat 1. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i bonitacji polowych wykonano 904 izolacje roślin. Powyższy materiał oceniono pod względem zawartości tłuszczu (%), kwasów tłuszczowych (%) oraz pod względem zawartości sumy glukozyzolanów i glukozyzolanów alkenowych ($\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Do dalszych badań wybrano 46 rekombinantów typu HO (zawierające geny mutantu wysokooleinowego) charakteryzujących się znacznym wzrostem zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (78,6%–83,1%). Z krzyżowań mutantów wysokooleinowych (typu HO) i niskolinolenowych (typu LL) do dalszych badań wybrano populację 110 rekombinantów typu HOLL wykazujących wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (73,7–84,0%) oraz obniżenie zawartości kwasu linolenowego (1,0–5,2%). W badaniach wykorzystano również kolekcję własną (uzyskaną w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L) form wysokooleinowych, form wysokotłuszczowych i niskoglukozyzolanowych. Z wyselekcjonowanych izolowanych pojedynczych roślin typu wysokotłuszczowego i niskoglukozyzolanowego do dalszych badań wybrano 45 genotypów o wysokiej zawartości tłuszczu (do 49,5%) oraz o ustabilizowanej bardzo niskiej zawartości glukozyzolanów alkenowych (0,8–2,8 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyzolanów (1,9–11,2 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Zawartość kwasu oleinowego w badanych genotypach wahała się (67,5–81,6%).

Temat 2. Dla określenia determinacji genetycznej cech jakościowych przeprowadzono krzyżowania w układzie diallelicznym pełnym w celu połączenia sześciu linii z wysoką zawartością kwasu oleinowego i niską zawartością kwasu linolenowego, wysoką zawartością tłuszczu i niską zawartością glukozyzolanów alkenowych. Uzyskano 30 mieszańców F_1 .

Na podstawie otrzymanych wyników utworzono podgrupy wartości średnich odrębnie dla każdej formy rodzicielskiej. Stwierdzono, że linia mutantu niskolinolenowego (M-681) typ LL o skrajnie obniżonej zawartości kwasu linolenowego (2,2%) niezależnie od kierunku krzyżowania w każdej badanej kombinacji wpływała na obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do minimum 2,1–4,2%). Natomiast linia 342/6i – typ HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (81,8%) i niskiej zawartości kwasu linolenowego (2,3%) wpływała niezależnie od kierunku krzyżowania nie tylko na obniżenie zawartości kwasu linolenowego (2,1–4,9%) ale również na wzrost zawartości kwasu

oleinowego (73,8-81,7%). Genotyp 565 - typ NGLS o najniższej zawartości glukozyzowanych powodował obniżenie tych związków tj. zawartości glukozyzowanych alkenowych (do $2,4\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyzowanych (do $6,4\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Przeprowadzona według metody Griffinga (1956) analiza wariancji diallelicznego układu krzyżowań dla zawartości kwasu oleinowego, linolowego i linolenowego oraz dla zawartości glukozyzowanych wykazała istotne różnicowanie efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej (ang. *general combining ability*, GCA) dla mieszańców pokolenia F_2 dla wszystkich badanych cech. Istotne różnicowanie specyficznej zdolności kombinacyjnej (ang. *specific combining ability*, SCA) oraz istotne efekty dla krzyżowań odwrotnych stwierdzono tylko dla zawartości sumy wszystkich glukozyzowanych oraz sumy glukozyzowanych alkenowych. Linie rodzicielskie (Polka typ HO, 342/6i typ HOLL) o wysokiej dodatniej wartości GCA dla kwasu oleinowego i ujemnej wartości GCA dla kwasu linolowego odpowiednio zwiększały zawartość kwasu oleinowego i obniżały zawartość kwasu linolowego w oleju z nasion mieszańców. Natomiast mutant (M681 typ LL) oraz linia (342/6i typ HOLL) o wysokiej ujemnej wartości GCA dla kwasu linolenowego wpływały na znaczne obniżenie zawartości tego kwasu. Na podkreślenie zasługuje również linia rodzicielska (565 typ NGLS) o wysokiej ujemnej wartości GCA dla zawartości sumy wszystkich glukozyzowanych oraz sumy glukozyzowanych alkenowych, która decydowała o znacznym obniżeniu tych związków. Tylko nieliczne mieszańce wykazywały istotne efekty specyficznej zdolności kombinacyjnej. Korzystne ujemne efekty dla cechy niskiej zawartości glukozyzowanych (pożądane ze względu na szersze wykorzystanie nasion jak i pozyskiwane z nich po odolejeniu śruty lub wytlóków jako wartościowej paszy wysokobiałkowej) odnotowano w czterech kombinacjach krzyżowań ($\text{HO} \times \text{HOLL}$), ($\text{HOLL} \times \text{MONOLIT}$), ($\text{MONOLIT} \times \text{WT}$) i ($\text{WT} \times \text{NGLS}$). W pozostałych przypadkach wartości SCA były nieistotne statystycznie. Analiza wariancji dla zawartości kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego oraz dla zawartości sumy wszystkich glukozyzowanych oraz sumy glukozyzowanych alkenowych wykazała, że addytywne działanie genów było istotne dla wszystkich badanych cech. Wykazano również, że istotna dominacja genów wystąpiła tylko dla sumy wszystkich glukozyzowanych oraz sumy glukozyzowanych alkenowych. Potwierdzono istotność asymetrii w rozkładzie alleli genów determinujących zawartość glukozyzowanych.

Temat 3. Najlepsze linie rekombinacyjne oceniono w doświadczeniu porównawczym PN1 (seria III). Linie te porównano do dwóch wysokoplennych odmian wzorcowych Marcelo i Monolit oraz dwóch linii mutantów M10464 typ HO i M681 typ LL (wykorzystywanych w hodowli jako źródło zmienności kwasów tłuszczowych: oleinowego, linolowego i linolenowego które zostały przeniesione do wartościowych gospodarczo rodów hodowlanych i odmian na drodze hodowli rekombinacyjnej). Sporządzona synteza wyników dla 25 obiektów wykazała, że plon nasion istotnie różnicował badane linie. Żadna linia nie przekroczyła poziomu plonowania wzorców natomiast 13 z nich plonowało powyżej średniej ogólnej (103,7-121,6%). Należy podkreślić, że wszystkie badane obiekty plonowały istotnie lepiej od dwóch linii mutantów. Świadczy to o dużym postępie hodowlanym otrzymanych rekombinantów. Pod względem zawartości tłuszczu 9 linii (46,5–48,6%) istotnie przewyższyło odmiany Marcelo (45,4%) i Monolit (45,5%). Stwierdzono wysokie różnicowanie genotypów pod względem składu kwasów tłuszczowych w oleju nasion. Badane linie typu HO utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (75,7–81,4%) natomiast linie typu HOLL z wysoką zawartością kwasu oleinowego na poziomie (77,6–84,0%) i obniżoną zawartością kwasu linolenowego na poziomie (2,4–4,7%). Stwierdzono również wysoką istotność różnicowania genotypów pod względem zawartości sumy glukozyzowanych i glukozyzowanych alkenowych. W stosunku do odmian wzorcowych Marcelo ($17,4\mu\text{M g}^{-1}$ nasion; $12,1\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) niższą zawartością sumy glukozyzowanych i glukozyzowanych alkenowych charakteryzowało się odpowiednio 22 i 20 genotypów natomiast w stosunku do odmiany Monolit ($11,9\mu\text{M g}^{-1}$ nasion; $7,6\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) odpowiednio 17 i 14 genotypów. Genotypy oceniono również pod względem cech struktury plonu. Cechy decydujące o plonowaniu: liczba rozgałęzień, liczba łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyńce oraz masa 1000 nasion istotnie różnicowały badane genotypy.

Wiosną 2017 roku kontynuowano I serię doświadczeń PN3 dla określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych. Ocenie podlegało 36 obiektów w tym 30 mieszańców pokolenia F_2 oraz 6 linii rodzicielskich. Sporządzona synteza wyników wykazała, że plon nasion istotnie różnicował zarówno mieszańce jak i linie rodzicielskie. Do najlepiej plonujących w przedziale (27,2-45,1dt/ha) zaliczono 13 mieszańców. Należy podkreślić, że kombinacje z wysokopłenną odmianą Monolit charakteryzowały się najwyższym plonowaniem. Najwyższą zawartością tłuszczu charakteryzowały się kombinacje z wysokołuszczywym genotypem 537 (45,5-46,1%). Istotnie najwyższą zawartością kwasu oleinowego (pożądaną ze względu na korzystne parametry dietetyczne) w stosunku do odmiany

wysokooleinowej Polka (78,0%) odnotowano u 5 mieszańców (78,5-79,9%). Natomiast najniższą zawartość kwasu linolenowego (wskazaną ze względu na wolniejszy proces oksydacji oleju) stwierdzono u 8 mieszańców (2,4-6,2%) zawierających zmutowany gen desaturazy FAD3 pochodzący od mutantu M681 (2,5%). Linia rodzicielska 565 o najniższej zawartości sumy glukozydów (5,6 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i glukozydów alkenowych (2,2 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) istotnie wpływała na obniżenie tych związków. Wiosną 2017 roku przeprowadzono ocenę przezimowania. Najslabiej zimowała linia rodzicielska M681 typ LL (4,1 w skali 1-9⁰). Linia ta również wpływała na gorsze zimowanie 5 mieszańców. Potwierdza to również procentowy udział przezimowanych roślin (32,4-69,5%). Najlepiej zimowały mieszańce w kombinacji z odmianą Monolit i Polką (74,9-94,3%). Genotypy oceniono również pod względem cech struktury plonu. Cechy decydujące o plonowaniu: liczba rozgałęzień, liczba łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyńce oraz masa 1000 nasion istotnie różnicowały badane genotypy. Stwierdzono istotną dodatnią korelację między plonem nasion a procentową zawartością tłuszczu (0,840), masą 1000 nasion (0,346), długość łuszczyń (0,758) i liczbą nasion w łuszczyńce (0,892). Oznacza to, że cechy: masa 1000 nasion, długość łuszczyń i liczba nasion w łuszczyńce w sposób istotny wpływały na poziom plonowania badanych genotypów. Istotnie dodatnią zależność stwierdzono również pomiędzy liczbą rozgałęzień, a liczbą łuszczyń na roślinie (0,637). Istotnie dodatnią korelację stwierdzono między długością łuszczyń a liczbą nasion w łuszczyńce (0,873).

Ważnym etapem procesu hodowlanego była ocena zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich na podstawie kombinacji mieszańcowych. Znajomość ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) linii umożliwia eliminację linii rodzicielskich, które przedstawiają małą wartość kombinacyjną. Natomiast znajomość specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) pozwala wytypować najbardziej korzystne kombinacje mieszańcowe. Przeprowadzona dialleliczna analiza wariancji opracowana wg Griffinga (1956) dla zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego oraz dla zawartości sumy wszystkich glukozydów i sumy glukozydów alkenowych w pokoleniu F₃ wykazała istotność różnic linii pod względem efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA). Natomiast istotność pod względem specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) mieszańców wykazano jedynie dla kwasu oleinowego i linolowego oraz glukozydów. Uzyskane wartości GCA linii rodzicielskich dla kwasów tłuszczowych: oleinowego, linolowego i linolenowego są wysoce istotnie zróżnicowane (na poziomie $\alpha=0,01$). Linie POLKA (typ HO), 342/6i (typ HOLL), 537 (typ WT) o wysokiej istotnie dodatniej wartości GCA dla kwasu oleinowego i ujemnej wartości GCA dla kwasu linolowego odpowiednio zwiększały zawartość kwasu oleinowego i obniżały zawartość kwasu linolowego w mieszańcach. Linie M681 (typ LL) i 342/6i (typ HOLL) o istotnie wysokiej ujemnej wartości GCA dla kwasu linolenowego wpływały na obniżenie zawartości tego kwasu w mieszańcach. Natomiast linia 565 (typ NGLS) o istotnie (na poziomie $\alpha=0,01$) wysokiej ujemnej wartości GCA dla zawartości sumy wszystkich glukozydów oraz sumy glukozydów alkenowych decydowała o znacznym obniżeniu tych związków. Wysoce istotne wartości GCA badanych linii wskazują na addytywne działanie genów determinujących zawartość badanych kwasów oraz glukozydów.

Nieliczne mieszańce F₃ wykazały istotne efekty SCA dla zawartości kwasów tłuszczowych. Dla dwóch kombinacji (342/6i x Monolit, 537 x 565) stwierdzono korzystny, dodatni efekt SCA dla zawartości kwasu oleinowego oraz dla dwóch kombinacji (342/6i x Monolit, 537 x 537) stwierdzono korzystny, ujemny efekt SCA dla zawartości kwasu linolenowego. Dla zawartości glukozydów odnotowano jedynie pojedyncze przypadki istotnych ujemnych lub dodatnich efektów SCA.

Na podstawie wykonanej analizy wariancji według Haymana (1954) uzyskano potwierdzenie addytywnego działania genów dla badanych kwasów tłuszczowych i glukozydów. Addytywne działanie jak i dominowanie genów miały istotny wpływ na zawartość kwasu oleinowego, linolowego oraz dla zawartości sumy wszystkich glukozydów oraz sumy glukozydów alkenowych w pokoleniu F₃. Dla tych cech wystąpiła ukierunkowana dominacja genów.

Informacje dotyczące działania genów determinujących zawartość kwasów tłuszczowych i glukozydów oraz wyznaczenie współczynników odziedziczalności dla tych cech mają dla hodowcy istotne znaczenie w zaplanowaniu prac selekcyjnych i przy wyborze metod hodowlanych. Rozróżnia się odziedziczalność w szerokim sensie jako stosunek zmienności genotypowej do fenotypowej oraz odziedziczalność w wąskim sensie jako stosunek zmienności addytywnej do fenotypowej. Dla analizowanych kwasów tłuszczowych otrzymano wysokie wartości tych współczynników (w szerokim sensie 0,94–0,95, w wąskim sensie 0,94–0,95). Wskazuje to zarówno na duży udział zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej badanych cech jak i znaczące addytywne działanie genów w dziedziczeniu tych cech. Niższe natomiast wartości tych

współczynników otrzymano dla glukozynolanów (w szerokim sensie dla sumy glukozynolanów 0,86 i glukozynolanów alkenowych 0,91, w wąskim sensie dla sumy glukozynolanów 0,69 i glukozynolanów alkenowych 0,58).

Temat 4. W sezonie wegetacyjnym 2017 roku genotypy o wysokiej wartości agronomicznej charakteryzujące się wysoką zawartością kwasu oleinowego i niską linolenowego poddano analizie DNA. Do tych badań włączono rekombinanty pokoleń F_{10} — F_3 typu HOLL (z genem mutantu wysokooleinowego oraz mutantu nisolinolenowego). Wykonano 171 analiz DNA. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3*.

W analizie przeprowadzonej metodą CAPS dla alleli genu *BnaA.FAD2* desaturazy *FAD2* wśród badanych genotypów wykazano 81 homozygotycznych prób o zmutowanym genotypie typu HOR4 (HOR4/HOR4). W pozostałych próbach wykazano genotyp homozygotyczny typu dzikiego (Dziki/Dziki).

Analizy na obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* przeprowadzone metodą SNaPshot zidentyfikowały 108 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci (genotyp aacc) oraz różne formy heterozygotyczne: 2 formy heterozygotyczne (genotyp aaCC) w których stwierdzono obecność zmutowanych alleli w genomie A *B. napus*, 13 form heterozygotycznych (genotyp Aacc) oraz 14 form heterozygotycznych (genotyp AAcc) w których stwierdzono obecność zmutowanych alleli w genomie C *B. napus*. W pozostałych formach typu dzikiego (genotyp AACC) nie stwierdzono obecności zmutowanych alleli zarówno w genomie A i C *B. napus*.

Mieszańce pokolenia F_2 uzyskane z krzyżowań diallelicznych oraz linie rodzicielskie (biorące udział w doświadczeniach polowych (I seria doświadczeń PN3) w celu określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych (temat badawczy 3) poddane zostały analizie DNA. Do badań wybrano obiekty z genem mutantu wysokooleinowego (typ HO) oraz mutantu nisolinolenowego (typ LL) oraz obiekty typu HOLL w których stwierdzono kumulację zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w genomach A i C *B. napus*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że u mieszańców z krzyżowań z linią rodzicielską (Polka typ HO, zawartość kwasu oleinowego 79,6%) niezależnie od kierunku krzyżowania stwierdzano obecność zmutowanych alleli w genomie *BnaA.FAD2* typu HOR4 (HOR4/HOR4). Potwierdza to również analiza biochemiczna wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 78,6%). W wyniku krzyżowania z linią 342/6i typ HOLL u większości mieszańców typu HOLL obserwowano kumulację zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w genomach A i C *B. napus*. Natomiast mutant M681 typ LL tylko w nielicznych kombinacjach powodował trwałą obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* (mieszaniec aacc).