

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

Temat badawczy 1

Fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych i biochemicznych

Cel tematu: Wybór genotypów o pożądanym parametrach agronomicznych oraz biochemicznych do dalszych badań związanych z przeprowadzeniem szczegółowej analizy genetycznej w odniesieniu do ekspresji cech fenotypowych, decydujących o wartości gospodarczej danego genotypu. Cel został osiągnięty w całości.

Materiały i metody

W 2016 roku badano 266 genotypów:

—27 rekombinantów pokoleń F_9 — F_4 typu HO (ang. high oleic) z genotypem mutantu wysokooleinowego o wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 78,2%–81,6%),

—70 rekombinantów pokoleń F_9 — F_3 typu HOLL (ang. high oleic low linolenic) o wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 85,6%) oraz o obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,8%),

—23 genotypy pokoleń F_9 — F_7 o wysokiej zawartości tłuszczu (do 48,0%) oraz o ustabilizowanej bardzo niskiej zawartości glukozyzolanów alkenowych (od 0,2–2,0 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyzolanów (od 1,6–5,4 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion),

—89 nowych linii rekombinacyjnych typu HO i HOLL pokolenia F_2 charakteryzujących się zawartością tłuszczu w nasionach (do 51,7%), wysoką zawartością kwasu oleinowego (do 81,1%), niską zawartością kwasu linolenowego (do 2,1%),

—57 linii niskoglukozyzolanowych pokoleń F_5 — F_4 o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 80,7%), niskiej zawartości glukozyzolanów alkenowych (0,5 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i wysokiej zawartości tłuszczu (do 51,4%).

Podczas wzrostu roślin wiosną i latem 2016 r. w szkółkach hodowlanych (przeprowadzono obserwacje cech związanych z wartością gospodarczą linii: przezimowanie (skala bonitacyjna 1-9⁰), wczesność (liczba dni od początku roku), długość kwitnienia (liczba dni), wyleganie (skala bonitacyjna 1-9⁰).

Wiosenne obserwacje i bonitacje polowe pomiędzy 266 genotypami pokoleń F_9 — F_2 dały podstawę do izolacji 1595 roślin. Zebrany materiał oceniano pod względem zawartości kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, linolenowego, eikozenowego i erukowego w oleju (%) oraz pod względem zawartości sumy glukozyzolanów i glukozyzolanów alkenowych ($\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) z wykorzystaniem chromatografii gazowej. W badanych materiałach (nasionach) oznaczono procentową zawartość tłuszczu za pomocą szerokopasmowego analizatora magnetycznego (NMR) firmy Newport Instruments Ltd).

Na podstawie obserwacji polowych (cech agronomicznych) i uzyskanych wyników biochemicznych do dalszych badań wybrano 165 genotypów pokoleń F_{10} — F_3 . Jesienią 2016r. powyższe 165 genotypów poddano ocenie: bonitacja wschodów (skala 1-9⁰), stan roślin przed zimą (skala 1-9⁰).

Przeprowadzono obliczenia statystyczne: analizy wariancji, wyznaczenie współczynników korelacji oraz porównanie średnich wykonane zostanie z wykorzystaniem programu EXEL

Wyniki

Z otrzymanych, izolowanych 1595 pojedynczych roślin do dalszych badań wybrano 41 genotypów typu HO z genotypem mutantu wysokooleinowego pokoleń F_6 — F_3 charakteryzujących się wzrostem zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 71,7%–81,7%). Zawartości sumy glukozyzolanów i glukozyzolanów alkenowych u badanych rekombinantów wahały się odpowiednio (od 4,6–17,7 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i (od 1,6–12,4 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). W analizowanych nasionach zawartość tłuszczu wahała się (od 37,1–47,8%). Z krzyżowań mutantów wysokooleinowych i niskolinolenowych do dalszych badań wybrano grupę 57 rekombinantów pokoleń F_{10} — F_3 typu HOLL wykazujących wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 72,1-82,4%) oraz obniżenie zawartości kwasu linolenowego (od 2,0-6,2%). U badanych genotypów typu HOLL zawartość tłuszczu wahała się (od 34,7-47,3%) natomiast zawartość sumy glukozyzolanów wynosiła (od 5,8–19,8 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion), a glukozyzolanów alkenowych (od 1,0–15,5 $\mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Do badań wykorzystano również kolekcję własną (uzyskaną w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L) form wysokooleinowych, form wysokotłuszczowych i niskoglukozynolanowych. Z wyselekcjonowanych izolowanych pojedynczych roślin typu wysokotłuszczowego i niskoglukozynolanowego do dalszych badań wybrano 67 genotypów pokoleń F₁₀—F₅ o wysokiej zawartości tłuszczu (do 49,3%) oraz o ustabilizowanej bardzo niskiej zawartości glukozynolanów alkenowych (od 0,2–3,7 μM g⁻¹ nasion) i sumy glukozynolanów (od 2,0–9,7 μM g⁻¹ nasion). Zawartość kwasu oleinowego w badanych genotypach wahała się (od 75,7–81,9%). Na podstawie powyższych obserwacji polowych (cech agronomicznych) i uzyskanych wyników biochemicznych do dalszych badań w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 wybrano 165 genotypów pokoleń F₁₀—F₃.

Dyskusja

Otrzymane w 2016 roku formy rzepaku ozimego typu HO charakteryzują się wzrostem zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 81,7%). 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) (6,4%) do zawartości C18:3 (omega-3) (6,0%) równy 1:1 jest optymalny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka (Szostak 2009). Drugim ważnym kierunkiem prac jest uzyskanie odmian typu HOLL o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (C18:1) do (≥ 75%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (C18:3) do (≤ 3%) (Rakow i in., 2007; Raney i in., 2007). U badanych genotypów typu HOLL wykazano wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 82,4%) oraz obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do 2,0%). Olej z tych odmian 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 (Matthäus i in., 2011).

Możliwości wykorzystywania białka, które pozostaje po ekstrakcji lub wytłoczeniu oleju w śrucie bądź wytlókach są limitowane przez związki antyżywniowe - glukozynolany alkenowe występujące w nasionach rzepaku. Z kolekcji własnej (uzyskanej w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L) form wysokooleinowych, form wysokotłuszczowych i niskoglukozynolanowych otrzymano genotypy o bardzo niskiej zawartości glukozynolanów alkenowych (do 0,2 μM g⁻¹ nasion) i sumy glukozynolanów (do 2,0 μM g⁻¹ nasion).

Wnioski (opisać jak w publikacji)

W wyniku przeprowadzonych badań poszerzono pulę genową w postaci wyselekcjonowanych linii rekombinacyjnych typu HO i HOLL łączących cechy wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozynolanów alkenowych.

Wyselekcjonowano grupę genotypów typu HO charakteryzujących się bardzo wysoką zawartością kwasu oleinowego w oleju nasion (do 81,7%), genotypy z wysoką zawartością tłuszczu (do 49,3%) oraz niską zawartością glukozynolanów alkenowych (do 0,2 μM g⁻¹ nasion) i sumy glukozynolanów (do 2,0 μM g⁻¹ nasion).

Uzyskano genotypy typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego do 82,4%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 2,0%).

Temat badawczy 2

Określenie determinacji genetycznej cech jakościowych

Cel tematu: Wyprowadzenie, drogą krzyżowań przemiennych w obrębie 10 wybranych genotypów, nowych form rzepaku o zróżnicowanej zawartości osiemnastowęglowych kwasów tłuszczowych jedno- i wielonienasyconych, podwyższonej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozynolanów dla określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych. Cel został osiągnięty w całości.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Do krzyżowań przemiennych w szklarni włączono 10 genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych 18-węglowych jedno- i wielonienasyconych, o wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozynolanów alkenowych:

- 1 linia mutantna typu LL ze znacznie obniżoną zawartością kwasu linolenowego (2,4%),
- 1 linia mutantna typu HO z wysoką zawartością kwasu oleinowego (78,8%),
- 1 rekombinant typu HO z wysoką zawartością kwasu oleinowego (80,0%),
- 2 rekombinanty typu HOLL z wysoką zawartością kwasu oleinowego (79,6; 78,1%) i niską zawartością kwasu linolenowego (2,8; 2,7%),

- 1 odmiana Monolit o typowym dla odmian rzepaku ozimego składzie kwasów tłuszczowych, tłuszczu i glukozyolanów,
- 2 rekombinanty o wysokiej zawartości tłuszczu (53,6; 53,1%),
- 2 rekombinanty o ekstremalnie niskiej zawartości sumy glukozyolanów alkenowych (0,2; 0,2 μ M g⁻¹nasion).

Krzyżowania przeprowadzono w układzie 10x10 po 3 krzyżowania dla tej samej kombinacji (celem uzyskania większej ilości nasion) tj. 300 krzyżowań, co dało 90 kombinacji F₁ i 10 form rodzicielskich.

Wzrost roślin i prowadzenie krzyżowań przebiegało w warunkach szklarniowych. Spośród 90 kombinacji F₁ i 10 form rodzicielskich na podstawie analiz biochemicznych wybrano 30 kombinacji F₁ i 6 linii rodzicielskich celem ich rozmnożenia i włączenia do badań nad dziedziczeniem składu kwasów tłuszczowych, tłuszczu i glukozyolanów oraz wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe badanych genotypów.

Jesienią 2016 roku w IHAR-PIB założono doświadczenie polowe z uzyskanymi 30 rekombinantami pokolenia F₁ oraz 6 liniami rodzicielskimi celem przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki genetycznej. Zebrane spod izolatorów nasiona pokolenia F₂ posłużyły do założenia doświadczeń polowych (temat badawczy 3) dla określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych (36 genotypów doświadczalnych x 4 powtórzenia x 3 lokalizacje) oraz wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe badanych genotypów.

Wyniki

Na podstawie wstępnych wyników stwierdzono, że linia mutanta niskolinolenowego (M-681) typ LL o skrajnie obniżonej zawartości kwasu linolenowego (2,0%) niezależnie od kierunku krzyżowania w każdej badanej kombinacji wpływała na obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do minimum 2,1–6,1%). Natomiast linia 342/6i/14 - typ HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (79,9%) i niskiej zawartości kwasu linolenowego (2,4%) wpływała nie tylko na obniżenie zawartości kwasu linolenowego (od 2,1- 5,0%) ale również na wzrost zawartości kwasu oleinowego (od 74,7-80,7%). Genotyp 565/1i/15 - typ NGLS o najniższej zawartości glukozyolanów powodował obniżenie tych związków tj. zawartości glukozyolanów alkenowych (do 1,4 μ M g⁻¹nasion) i sumy glukozyolanów (do 3,4 μ M g⁻¹nasion).

Dyskusja

Dla dokładniejszej oceny sposobu dziedziczenia kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego oraz tłuszczu i glukozyolanów do badań wybrano genotypy rzepaku ozimego o znacznym zróżnicowaniu tych cech. Tak duże zróżnicowanie kwasów tłuszczowych u badanych genotypów dało podstawę do stwierdzenia, że zawartość kwasu oleinowego i linolenowego u mieszańców warunkowana jest prawie w równym stopniu przez genotyp mateczny, jak i przez genotyp ojcowski. Podobne wyniki uzyskał Zhang i wsp. (2004) badając w pokoleniu F₂ i F₃ dziedziczenie zawartości kwasu oleinowego. W celu określenia wpływu efektów cytoplazmatycznych, genetycznych (jądrowych) matki czy zarodka na zawartość wszystkich analizowanych cech badania należy kontynuować w kolejnych latach.

Wnioski

Wytypowano 30 mieszańców o zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych, tłuszczu i glukozyolanów alkenowych, które będą wykorzystane dla określenia determinacji genetycznej tych cech.

Temat badawczy 3

Ocena genotypów w doświadczeniach porównawczych

Celem tematu jest analiza genetycznego uwarunkowania oraz wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe badanych genotypów na podstawie przeprowadzonych doświadczeń. Cel został osiągnięty w całości

Materiały i metody

Kontynuowano II serię doświadczeń w których oceniono 25 genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych 18-węglowych jedno- i wielonienasyconych, tłuszczu i glukozyolanów.

Doświadczenia polowe założono jesienią 2015 roku w 2-ch lokalizacjach, Stacjach Hodowli Roślin: Borowo „Spółka Hodowli Roślin Strzelce” i Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice” w układzie bloków losowanych kompletnych, w czterech powtórzeniach w terminie optymalnym dla rzepaku ozimego. Doświadczenia prowadzono zgodnie z najnowszymi standardami technologii uprawy przyjętymi dla rzepaku ozimego.

Po ruszeniu wegetacji wiosną 2016 wykonano następujące pomiary i obserwacje:

1. bonitacja przezimowania (skala 1–9) – dwa tygodnie po ruszeniu wegetacji;
2. liczenie roślin na oznaczonej na poletku powierzchni 3 m²;
3. pomiar zawartości chlorofilu w liściach przy użyciu chlorometru N tester SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development);
4. oznaczanie daty początku kwitnienia w celu określenia wczesności licząc liczbę dni od początku roku kalendarzowego do momentu zakwitnięcia około 10% roślin;
5. oznaczanie daty końca kwitnienia – 90% roślin zakończyło kwitnienie;
6. wysokość roślin (cm);
7. wyleganie (skala 1–9).

Analiza struktury plonu (przed zbiorem do pomiarów biometrycznych pobierano z każdego genotypu po 5 kolejnych roślin z każdego poletka (4 powtórzenia) w celu dokładnego oznaczenia podstawowych 5 elementów składowych plonu takich jak:

1. liczba rozgałęzień;
2. liczba łuszczyń na roślinie;
3. długość łuszczyń;
4. liczba nasion w łuszczyńce;
5. masa 1000 nasion.

Oszacowano plon nasion dla 200 obiektów w przeliczeniu na q/ha:

W zebranych nasionach oznaczono:

1. zawartość tłuszczu (% s.m.);
2. zawartość kwasów: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, linolenowego, eikozenowego i erukowego w oleju (%);
3. zawartość sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych ($\mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Jesienią 2016 roku założono dwie serie doświadczeń z 61 genotypami:

–III serię doświadczeń porównawczych (25 genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych typu HO i HOLL w 4 powtórzeniach w 2 lokalizacjach: Stacja Hodowli Roślin: Borowo „Spółka Hodowli Roślin Strzelce” i Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice”) w układzie bloków losowanych.

–I serię doświadczeń dla określenia determinacji genetycznej ważnych cech fenotypowych (36 obiektów doświadczalnych w 4 powtórzeniach w 3 lokalizacjach) założono w: Oddziałach Hodowli Roślin: Borowo i Małyszyn „Spółka Hodowli Roślin Strzelce” oraz w Oddziale Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice”) w układzie bloków losowanych. Doświadczenia założono w terminie optymalnym dla rzepaku ozimego. Jesienią na nowo założonych doświadczeniach III i I serii przeprowadzono 4 pomiary i obserwacje:

1. bonitacja wschodów (skala 1-9);
2. bonitacja stanu roślin przed zimą (skala 1-9);
3. liczenie roślin na oznaczonej na poletku powierzchni 3 m²;
4. pomiar zawartości chlorofilu w liściach przy użyciu chlorometru N tester SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development).

Przeprowadzono obliczenia statystyczne: analizy wariancji, wyznaczenie współczynników korelacji oraz porównanie średnich wykonano z wykorzystaniem programu EXEL i STATISTICA.

Wyniki

Sporządzona synteza wyników dla 25 obiektów wykazała, że linie 880/1i+8i+13i/15 (32,0 dt/ha) i 440/3i/899LA/15 typu HOLL (31,2 dt/ha) oraz linia 593/2i+5i+6i/15 o niskiej zawartości glukozyolanów i wysokiej zawartości tłuszczu (31,4dt/ha) plonowały powyżej odmiany wzorcowej Monolit (31,1 dt/ha). Pod względem zawartości tłuszczu 3 linie (47,6–48,2%) istotnie przewyższyły odmianę Monolit (45,6%). Badane linie typu HO utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (75,2–78,4%) natomiast linie typu HOLL wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (75,4–78,4%) i obniżoną zawartość kwasu linolenowego na poziomie (3,2–5,4%). Stwierdzono wysoką istotność zróżnicowania genotypów pod względem zawartości sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych. W stosunku do odmian wzorcowych Arsenal ($12,6\mu\text{M g}^{-1}$ nasion; $9,2\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) niższą zawartością sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych charakteryzowało się odpowiednio 17 i 21 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 17 genotypów.

Cecha przezimowania istotnie różnicowała badane genotypy. Potwierdza to procentowy udział przezimowanych roślin (od 50,1-88,7%). Badane genotypy pod względem wczesności były wysoce istotnie zróżnicowane, najwcześniej zakwitły 2 rekombinanty typu HOLL z genotypem mutanta LL (109,5; 110,8 dni od początku roku) i genotyp o niskiej zawartości glukozyolanów (110,5 dni od

początku roku), które można zaliczyć do form najwcześniejszych. Rekombinanty te charakteryzowały się również najdłuższym okresem kwitnienia (32-34 dni). Wysokość roślin była istotnie zróżnicowana. Najniższymi roślinami charakteryzował się mutant typu LL M681 (73 cm) a najwyższymi cechował się wysokooleinowy rekombinant 550/2i,3i/15 (159 cm). Genotypy oceniono również pod względem cech struktury plonu. Cechy: liczba rozgałęzień i długość łuszczyń na roślinie nie wykazały zróżnicowania rekombinantów natomiast cechy liczba nasion w łuszczyńce oraz masa 1000 nasion istotnie różnicowały badane genotypy.

Przedstawiono również współczynniki korelacji pomiędzy plonem nasion genotypów, składnikami plonu oraz zawartością tłuszczu i kwasów tłuszczowych. Stwierdzono istotną dodatnią korelację między plonem nasion a liczbą łuszczyń na roślinie (0,449), długością łuszczyń (0,521), liczbą nasion w łuszczyńce (0,596) oraz wysokością roślin (0,602). Oznacza to, że te cechy w sposób istotny wpływały na poziom plonowania genotypów. Istotnie dodatnią zależność stwierdzono również pomiędzy liczbą rozgałęzień, a liczbą łuszczyń na roślinie (0,719) oraz pomiędzy liczbą łuszczyń na roślinie, a wysokością roślin (0,500). Istotnie dodatnią korelację stwierdzono między długością łuszczyń a liczbą nasion w łuszczyńce (0,687). Różnice w zawartości kwasów tłuszczowych w nasionach tych linii nie są już skorelowane z plonem nasion oraz z masą 1000 nasion tak więc, dalsze różnicowanie kwasów tłuszczowych nie powinno wpływać niekorzystnie na plenność nowych linii hodowlanych. Odnotowano również wysoce istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy zawartością kwasu oleinowego a zawartościami kwasów linolowego (-0,892). Ta zależność może być wykorzystana w pracach nad różnicowaniem składu kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego.

Dyskusja

Wyselekcjonowane linie rekombinacyjne typu HO i HOLL oraz linie o obniżonej zawartości glukozyzolanów w nasionach osiągnęły poziom plonowania zbliżony do uprawianych obecnie odmian populacyjnych. Według badań własnych oraz Wójtowicza i Muśnickiego (2001, 2001a) plon w dużej mierze zależy od uwarunkowanego genetycznie potencjału plonotwórczego genotypu oraz od jego reakcji na warunki środowiskowe i agrotechniczne. Czynniki te kształtują plon poprzez bezpośredni wpływ na elementy struktury plonu. Analiza zależności między plonem a cechami plonotwórczymi, zwłaszcza składowymi plonu dostarcza wiedzy o ich ilościowej roli w kształtowaniu plonu (Mądry i in. 2003). Określenie tych zależności może stanowić ważne kryterium selekcji roślin na plon w pracach hodowlanych form rzepaku ozimego. Udział poszczególnych składowych w kształtowaniu plonu może być niejednakowy. Z przeprowadzonych badań wynika że największy wpływ na plon linii rekombinacyjnych miała wysokość roślin i liczba nasion w łuszczyńce, a w dalszej kolejności długość łuszczyń i liczba łuszczyń na roślinie. Poznane zależności i współzależności pomiędzy analizowanymi cechami pozwalają miarodajnie określić wpływ poszczególnych składowych na plon nasion (Śmiałowski i Bichoński 2003, Budzyński i Jankowski 2003, Jankowski i Budzyński 2003).

Wnioski

Linie 880/1i+8i+13i/15 (32,0 dt/ha) i 440/3i/899LA/15 typu HOLL (31,2 dt/ha) oraz linia 593/2i+5i+6i/15 o niskiej zawartości glukozyzolanów i wysokiej zawartości tłuszczu (31,4dt/ha) plonowały powyżej odmiany wzorcowej Monolit (31,1 dt/ha).

Pod względem zawartości tłuszczu 3 linie (47,6–48,2%) istotnie przewyższyły odmianę Monolit (45,6%).

Badane linie typu HO utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (75,2–78,4%) natomiast linie typu HOLL wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (75,4–78,4%) i obniżoną zawartością kwasu linolenowego na poziomie (3,2–5,4%).

Stwierdzono wysoką istotność zróżnicowania genotypów pod względem zawartości sumy glukozyzolanów i glukozyzolanów alkenowych. W stosunku do odmian wzorcowych Arsenal (12,6 μ M g⁻¹ nasion; 9,2 μ M g⁻¹ nasion) niższą zawartością sumy glukozyzolanów i glukozyzolanów alkenowych charakteryzowało się odpowiednio 17 i 21 genotypów natomiast w stosunku do odmiany Monolit (11,9 μ M g⁻¹ nasion; 7,6 μ M g⁻¹ nasion) odpowiednio 17 i 17 genotypów.

Badane genotypy wykazały wysoce istotne zróżnicowanie pod względem dwóch cech struktury plonu (cechy: liczba nasion w łuszczyńce oraz masa 1000 nasion istotnie różnicowały genotypy).

Z przeprowadzonych badań wynika że istotnie największy wpływ na plon linii rekombinacyjnych miała wysokość roślin (0,602) i liczba nasion w łuszczyńce (0,596), a w dalszej kolejności długość łuszczyń (0,521) i liczba łuszczyń na roślinie (0,449).

Temat badawczy 4

Genotypowanie roślin

Celem tematu jest identyfikacja niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w liniach obejmujących rekombinanty typu HOLL oraz ich formy rodzicielskie. Zmutowane allele genów enzymu desaturazy *FAD2* z genomów A i C rzepaku odpowiedzialne są za podwyższoną zawartość kwasu oleinowego (typ HO) w oleju nasion rzepaku, natomiast zmutowane allele genów enzymu desaturazy *FAD3* z genomów A i C rzepaku – za obniżoną zawartość kwasu linolenowego (typ LL). Przeprowadzone badania umożliwią w latach następnych analizę dziedziczenia cech zawartości kwasów oleinowego i linolenowego na poziomie molekularnym oraz odniesienie do dziedziczenia cech fenotypowych. Cel został osiągnięty w całości.

Materiały i metody

Do badań wybrano 89 genotypów o wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskiej zawartości kwasu linolenowego. Na tym materiale wykonano 89 prób genomowego DNA. Genomowy DNA został wyizolowany z młodych siewek linii mutantów typu HO z wysoką zawartością kwasu oleinowego, linii mutantów typu LL ze znacznie obniżoną zawartością kwasu linolenowego oraz z rekombinantów typu HOLL metodą ekstrakcji buforem z CTAB według Doyle'. Przeprowadzono analizy za pomocą markera CAPS specyficznego dla alleli genu desaturazy *FAD2* oraz allelo-specyficznych markerów funkcjonalnych dla genów desaturazy *FAD3* w genomach A i C rzepaku.

Wyniki

W analizie przeprowadzonej metodą CAPS dla alleli genu desaturazy *FAD2* wśród 89 badanych prób wykryto 4 homozygotyczne próby o genotypie HOR3/HOR3 oraz 1 heterozygotyczną próbę o genotypie Dziki/HOR3, a także 21 homozygotycznych prób o genotypie HOR4/HOR4 i 17 heterozygotycznych prób o genotypie Dziki/HOR4. Pozostałe próby wykazały genotyp Dziki/Dziki.

Analizy na obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* przeprowadzone metodą SNaPshot wykazały, że spośród 89 przebadanych genotypów zidentyfikowano 18 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci (genotyp aacc), 7 genotypów typu dzikiego (AACC) oraz różne formy heterozygotyczne: AAcc– 26 genotypów, Aacc– 12, AaCc– 11, AACc– 4, AaCC– 6, aaCC– 1, aaCc– 4. Wśród genotypów o obniżonej zawartości kwasu linolenowego i charakteryzujących się wysoką wartością agronomiczną stwierdzono zmutowane homozygotyczne formy w genomie C (haplotyp ac, Ac).

Na podstawie zastosowanych obu metod wyodrębniono 21 pożądaných form typu HOLL, w których stwierdzono kumulację zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w genomach A i C *B. napus* oraz 4 formy typu HO ze zmutowanymi allelami genu *FAD2*. Genotypy te wyselekcjonowano w powiązaniu z najlepszymi cechami agronomicznymi.

Dyskusja

Wraz z rozwojem technik molekularnych powstały nowe perspektywy dla hodowli odmian typu HO i HOLL. Do identyfikacji mutacji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za podwyższoną zawartość kwasu oleinowego (desaturaza *FAD2*) i obniżoną kwasu linolenowego (desaturaza *FAD3*) opracowano specyficzne markery genetyczne (odpowiednio, Falentin i in., 2007; Mikołajczyk i in., 2010). 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 rekombinantów typu HO i HOLL rzepaku ozimego (Mikołajczyk i wsp., 2010). Zastosowane metody badawcze analizy należą do unikalnych w świecie (Hu i in., 2006), stanowiąc efektywne narzędzie selekcji materiałów roślinnych do dalszych badań.

Wnioski

Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* wyrażających się fenotypem typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 80%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (ok. 3,0%).

Na podstawie zastosowanych obu metod spośród 89 przebadanych genotypów wyodrębniono 21 pożądaných form typu HOLL, w których stwierdzono kumulację zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w genomach A i C *B. napus* oraz 4 formy typu HO ze zmutowanymi allelami genu *FAD2*. Genotypy te wyselekcjonowano w powiązaniu z najlepszymi cechami agronomicznymi.