**Streszczenie zadania za 2020 r. w Programie Badań Podstawowych w Produkcji Roślinnej.**

**Zadanie 53. Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych.**

Kierownik zadania: dr hab. Stanisław Spasibionek

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin ― PIB, Oddział w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań, telefon: 61 846 42 20, e-mail [s.spasibionek@ihar.edu.pl](mailto:s.spasibionek@ihar.edu.pl)

Zadanie realizowano w ramach czterech tematów badawczych:

**Cel zadania:**

1. Poszukiwanie nowych źródeł zmienności o pożądanych 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.
2. Ocena nowych form rzepaku (wyprowadzonych drogą krzyżowań linia x tester) o zróżnicowanej zawartości 18-to węglowych kwasów tłuszczowych jedno- i wielonienasyconych, o podwyższonej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozynolanów dla określenia efektów ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej ważnych cech fenotypowych.
3. Ocena nowych genotypów w doświadczeniach porównawczych pod względem cech jakościowych i agronomicznych oraz oszacowanie wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe wybranych genotypów.
4. Poszukiwanie różnych form allelicznych oraz monitorowanie występowania niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w populacjach obejmujących rekombinanty typu HO, LL, HOLL oraz ich formy rodzicielskie z wykorzystaniem markerów genetycznych.

**Wyniki:**

**Fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych i biochemicznych.**

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji fenotypowania roślin stwierdzono duże zróżnicowanie pod względem wczesności. Przedział wczesności zawierał się (od 99 do 110 dni od początku roku). Badane genotypy nie wykazały zróżnicowania pod względem wylegania. W trakcie kwitnienia przeprowadzono izolację roślin wybranych genotypów. Zaizolowane 1225 roślin poddano ocenie na zawartość kwasów tłuszczowych, zawartość sumy glukozynolanów i glukozynolanów alkenowych oraz na zawartość tłuszczu. Na podstawie tych badań w pokoleniach rekombinantów F10―F5 typu HO z genotypem mutanta wysokooleinowego stwierdzono wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (75,6―80,5%) natomiast wśród rekombinamtów typu HOLL z krzyżowań mutantów wysokooleinowych typu HO i niskolinolenowych typu LL stwierdzono wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 83,8%) i obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do 1,5%). Rekombinanty typu HO i HOLL charakteryzowały się zawartością tłuszczu na poziomie (33,6―51,4%) natomiast zawartość sumy glukozynolanów wynosiła (od 1,4―21,8µM g-1nasion), a glukozynolanów alkenowych (od 0,2―13,9µM g-1nasion).

Do badań wykorzystano również kolekcję własną (uzyskaną w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L.) form wysokooleinowych, form wysokotłuszczowych i niskoglukozynolanowych. W wyselekcjonowanych izolowanych roślinach typu HO&LGLS pokoleń F9―F7 stwierdzono wysoką zawartości tłuszczu na poziomie (38,3―51,3%) oraz ustabilizowaną bardzo niską zawartość glukozynolanów alkenowych (od 0,2–3,0µM g-1nasion) i sumy glukozynolanów (od 0,4–11,7µM g-1nasion). Zawartość kwasu oleinowego w badanych genotypach wahała się (od 70,0–82,6%).

**Określenie determinacji genetycznej cech jakościowych.**

W celu uzyskania większych zmian pod kątem wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskej zawartości kwasu linolenowego, wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozynolanów przeprowadzono badania w układzie linia x tester. W warunkach polowych na poletkach w IHAR-PIB w Poznaniu założono doświadczenie z 24 mieszańcami F1, 12 liniami rodzicielskimi i 2 testerami.

Przeprowadzona analiza wariancji układu linia x tester dla zawartości tłuszczu, kwasu oleinowego, linolowego i linolenowego oraz dla zawartości glukozynolanów wykazała istotne zróżnicowanie badanych obiektów.

Obliczone efekty ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla linii rodzicielskich i testerów wskazują na istotny, a jednocześnie różny wpływ na potomstwo. Stwierdzono, że tylko linia mateczna (L18) i tester (T24) istotnie wpływały na wzrost zawartości tłuszczu w nasionach mieszańców. Na szczególne podkreślenie zasługują cztery linie rodzicielskie (L11, L12, L13, L14) typu HOLL o istotnie najwyższej dodatniej wartości GCA dla kwasu oleinowego i istotnie najwyższej ujemnej wartości GCA dla kwasu linolenowego, które odpowiednio zwiększały zawartość kwasu oleinowego i obniżały zawartość kwasu linolenowego w nasionach mieszańców. Należy również zwrócić uwagę na cztery linie (L14, L19, L20, L22) charakteryzujące się istotnie najwyższymi ujemnymi wartościami GCA, które wpływały na obniżenie związków antyżywieniowych (glukozynolanów) w nasionach. W przypadku pozostałych linii napotyka się na trudności jednoznacznej oceny ze względu na równoczesne występowanie dodatnich i ujemnych efektów. Na przykładzie wyróżnionych linii widać jak trudno jest połączyć wszystkie korzystne wartości GCA w jedną całość. W przypadku testerów, którymi były ustalone linie wsobne istotne efekty są jeszcze mniej częste. Na wyróżnienie zasługuje tester (T24) ze względu na istotny dodatni efekt dla zawartości tłuszczu i istotny ujemny efekt dla związków antyżywieniowych (glukozynolanów). Natomiast tester( T23) zmniejszał jedynie zawartość kwasu linolenowego w nasionach, pożądaną ze względu na spowolnienie procesu oksydacji oleju. Łączne rozpatrywanie kilku cech wyraźnie utrudnia jednoznaczną ocenę testerów.

Tylko nieliczne mieszańce wykazywały istotne efekty specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA). Korzystne ujemne efekty dla cechy niskiej zawartości glukozynolanów (pożądane ze względu na szersze wykorzystanie nasion jak i pozyskiwane z nich po odolejeniu śruty lub wytłoków jako wartościowej paszy wysokobiałkowej) odnotowano w kombinacji krzyżowań (11x24). Korzystne dodatnie efekty dla cechy podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i ujemne efekty dla cechy niskiej zawartości kwasu linolenowego (pożądanego ze względu na wolniejszy proces oksydacji oleju) odnotowano w trzech kombinacjach krzyżowań (13x24, 15x24, 20x23).

**Ocena genotypów w doświadczeniach porównawczych.**

Wiosną 2020 roku kontynuowano I serię doświadczeń PN1w których ocenie podlegało 25 obiektów typu HO, HOLL, HO&LGLS oraz wzorzec (odmiana populacyjna w typie canola) Ilona. Po ruszeniu wegetacji przeprowadzono ocenę przezimowania. Istotnie lepiej od odmiany wzorcowej Ilona zimowały dwa genotypy (855/19 – 8,7% i 824/19 – 8,8% przezimowania w skali 1-9%). Badane genotypy pod względem wczesności były wysoce istotnie zróżnicowane. Przedział wczesności zawierał się (od 100,0 do 112 dni od początku roku). W stosunku do średnio wczesnej odmiany wzorcowej Ilona (109) istotnie wcześniej zakwitło 16 genotypów (100-109 dni od początku roku), które uznano za formy bardzo wczesne i wczesne, pożądane w hodowli. Cecha „długość kwitnienia” również istotnie różnicowała genotypy, była jednak mocno zależna od przebiegu pogody. Wysokość roślin była istotnie zróżnicowana od bardzo niskich do wysokich (114,3-149,0 cm). Cecha ta nie wpłynęła na wyleganie roślin (7,0-9,0 w skali 1-90).

Sporządzona synteza wyników dla 25 obiektów wykazała, że plon nasion istotnie różnicował badane genotypy. Do najlepiej plonujących w przedziale (46,4–50,8 dt/ha) zaliczono 17 genotypów. Pod względem zawartości tłuszczu 2 genotypy 829/19 (47,3%) i 824/19 (46,7%) istotnie przewyższyły odmianę Ilona (45,4%). Stwierdzono wysoką istotność zróżnicowania genotypów pod względem składu kwasów tłuszczowych w oleju nasion. Badane linie typu HO&LGLS utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (77,4–79,7%), natomiast linie typu HOLL wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (77,3–80,7%) i obniżoną zawartość kwasu linolenowego na poziomie (3,4–5,6%) natomiast linie typu HOLP wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (78,4–79,5%) i obniżoną zawartość sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) na poziomie (11,7-14,1%). Stwierdzono również wysoką istotność zróżnicowania genotypów pod względem zawartości związków antyżywieniowych: sumy glukozynolanów i glukozynolanów alkenowych. W stosunku do odmiany wzorcowej Ilona (16,7µM g-1 nasion; 11,6µM g-1 nasion) niższą zawartością sumy glukozynolanów i glukozynolanów alkenowych charakteryzowały się wszystkie 24 badane genotypy odpowiednio (5,4–15,5µM g-1 nasion) i (1,9–9,8µM g-1 nasion).

W celu oceny środowisk w których badano genotypy obliczono macierz współczynników korelacji dla dwóch środowisk tj Borowa i Łagiewnik. Na tej podstawie stwierdzono istotnie wysoką korelację między tymi środowiskami dla większości badanych cech tj. dla plonu nasion, zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego oraz dla zawartości glukozynolanów alkenowych i sumy wszystkich glukozynolanów. Niżsą wartość korelacji między miejscowościami stwierdzono dla zawartości tłuszczu w nasionach.

**Genotypowanie roślin.**

Do tych badań włączono 68 rekombinantów typu HO charakteryzujących się bardzo wysoką zawartością kwasu oleinowego w oleju nasion (do 82,6%) oraz typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 83,8%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,5%). Wykonano 186 analiz DNA. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3.* Wykorzystanie markerów genetycznych w hodowli znacznie zwiększa efektywność i skuteczność selekcji. Stanowią one dogodne narzędzie selekcyjne, wspomagające i uzupełniające tradycyjne metody w oparciu o czaso- i pracochłonną analizę cech morfologicznych i biochemicznych których ekspresja ulega często modyfikującemu wpływowi środowiska. W analizie przeprowadzonej metodą CAPS badano obecność mutacji typu HOR3 i HOR4 w genie *BnaA.FAD2* rzepaku.Dla 24 prób wykazano genotyp homozygotyczny typu HOR4 **(HOR4 / HOR4)**. Dla 2 prób wykazano genotyp heterozygotyczny typu HOR4 **(HOR4 / Dziki)**. Dla 44 prób wykazano genotyp homozygotyczny typu dzikiego **(Dziki / Dziki)**.

Na podstawie analiz na obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* przeprowadzonych metodą SNaPshot zidentyfikowano 15 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci (**genotyp aacc**) w których stwierdzono obecność zmutowanych alleli w genomie A i B *B. napus* oraz różne formy heterozygotyczne: 25 fom heterozygotycznych (**genotyp AAcc**), 3 formy (**genotyp aaCC**), 1 forma (**genotyp AaCC**), 3 formy (**genotyp Aacc**). W pozostałych formach typu dzikiego (**genotyp AACC**) nie stwierdzono obecności zmutowanych alleli zarówno w genomie A i C *B. napus*. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturazy *FAD3* i wyeliminować również samosiewy rzepaku scharakteryzowane jako forma dzika (genotyp AACC).

**Wnioski:**

1. 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.
2. Wyselekcjonowano genotypy typu HO charakteryzujące się bardzo wysoką zawartością kwasu oleinowego w oleju nasion (do 82,6%), genotypy z wysoką zawartością tłuszczu (do 51,4%) oraz niską zawartością glukozynolanów alkenowych (do 0,2µM g-1nasion) i sumy glukozynolanów (do 0,4µM g-1nasion).
3. Uzyskano genotypy typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 83,8%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,5%).
4. Uzyskane dotychczas wyniki z przeprowadzonych badań biochemicznych, molekularnych i doświadczeń polowych dały podstawę do kontynuowania badań ukierunkowanych na wytworzenie krajowej odmiany populacyjnej rzepaku ozimego o wysokiej zawartości tłuszczu i zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych przy jednocześnie odpowiedniej wartości rolniczej warunkującej jej praktyczną popularyzację w uprawie. 50 genotypów typu HOLL zostało włączonych do dalszych badań w ramach projektu komercyjnego NR 3/2020/PSPO (lata 2020-2023) „**Wytworzenie odmiany populacyjnej rzepaku ozimego o wysokiej zawartości tłuszczu i zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych”,** finansowanego przez Fundusz Promocji Roślin Oleistych.
5. W ramach niniejszego zadania zidentyfikowano ważne genotypy rodzicielskie, takie jak L11, L12, L13, L14 (typ HOLL) L18 (typ HO) L19, L20, L22 (typ HO&LGLS) oraz tester T24 (typ HOLL), które można wykorzystać w programie krzyżowania w celu wytworzenia maksymalnej zmienności w kierunku zmian proporcji kwasów tłuszczowych, głównie kwasu oleinowego i linolenowego oraz zawartości tłuszczu i glukozynolanów w nasionach.
6. Linie o wysokich efektach GCA dla poszczególnych cech przenosiły pozytywne efekty na SCA mieszańców. Na podstawie efektów SCA wytypowano 3 najbardziej korzystne kombinacje krzyżowań (13x24, 15x24, 20x23) do dalszej selekcji pod kątem zmian badanych cech. Te kombinacje umożliwiają wyselekcjonowanie odmian w typie HOLL.
7. Należy podkreślić że linie typu HO - 806/19 (50,8 dt/h), HOLP - 855/19 (49,3 dt/h), LGLS - 863/19 (49.0 dt/h), 813/19 (48,8 dt/h) i HOLL - 865/19 (49,0 dt/h), 836/19 (48,7 dt/h), 843/19 (48,3 dt/ha), osiągnęły najwyższy spośród badanych genotypów plon zblizony do odmiany Ilona (58,8 dt/h).
8. Badane linie typu HO&LGLS utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (77,4–79,7%) oraz znacznie obniżoną zawartość związków antyżywieniowych, glukozynolanów alkenowych do poziomu (1,9 µM g-1 nasion) a sumy glukozynolanów do poziomu (5,4 µM g-1 nasion) w porównaniu do odmiany Ilona, odpowiednio (11,6 µM g-1 nasion) i (16,7 µM g-1 nasion).
9. Linie typu HOLL uzyskały wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (76,2–80,7%) i obniżoną zawartość kwasu linolenowego do poziomu (3,4%) natomiast linie typu HOLP wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (78,4–79,5%) i obniżoną zawartość sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) do poziomu (11,7%).
10. Uzyskano rekombinanty znacznie wcześniejsze niż średniowczesna odmiana populacyjna Ilona.
11. Zastosowanie markerów genetycznych w hodowli zwiększyło efektywność i skuteczność selekcji. Stanowią one dogodne narzędzie selekcyjne, wspomagające i uzupełniające tradycyjne metody w oparciu o czaso- i pracochłonną analizę cech morfologicznych, fenologicznych i fenotypowych, których ekspresja ulega często modyfikującemu wpływowi środowiska.
12. W oparciu o zastosowane w selekcji markery typu CAPS i SNP wyodrębniono 24 homozygotyczne próby o zmutowanym genotypie typu HOR4 (HOR4/HOR4) oraz 2 próby wykazujące genotyp heterozygotyczny typu HOR4 (HOR4 / Dziki). Zidentyfikowano 15 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci w genomach A i C *B. napus* (typ genotypu aacc). Genotypy te wyselekcjonowano w powiązaniu z najlepszymi cechami agronomicznymi.
13. Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* wyrażających się fenotypem typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 75,6-81,5%) oraz fenotypem typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 73,3-82,4%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (od 1,7-4,9%).

Publikacje

Spasibionek S, Mikołajczyk K, Ćwiek–Kupczyńska H, Piętka T, Krótka K, Matuszczak M, Nowakowska J, Michalski K, Bartkowiak-Broda I. (2020) Marker assisted selec­tion of new high oleic and low linolenic winter oilseed rape (*Brassica napus L*.) inbred lines revealing good agricultural value. PLoS ONE 15 (6): e0233959. https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0233959, IF 2.776 (MEiN – 100pkt.)

Matuszczak M, Spasibionek S, Gacek K, Bartkowiak-Broda I. 2020. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker for identification of two mutant alleles of the rape­seed *BnaA.FAD2* gene. Mol Biol Rep 47: 7607–7621, https://doi.org/10.1007/s11033‒020‒05828‒2, IF 1.402 (MEiN – 70pkt.)