

SELEKCJA MUTANTÓW RZEPAKU OZIMEGO
(*BRASSICA NAPUS* L.) O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW
ANTYŻYWIENIOWYCH PRZY UDZIALE SPEKTROMETRII
ODBICIOWEJ W BLISKIEJ PODCZERWIENI (NIRS)

Jan Olejniczak¹, Małgorzata Adamczak¹, Andrzej Wojciechowski²

¹Institut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
e-mail: jole@igr.poznan.pl

²Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-112 Poznań

Streszczenie. Wzrost zainteresowania rzepakiem związany jest z dużymi możliwościami jego wykorzystania tak do celów przemysłowych jak i konsumpcyjnych. Jakość oleju oraz śruty rzepakowej związana jest między innymi z zawartością składników antyżywnościowych w nasionach takich jak np. glukozynolany, sinapina, kwas fitynowy. Jednym ze sposobów zwiększenia zakresu zmienności cech decydujących o jakości produktów otrzymywanych z nasion rzepaku jest mutageneza. Nasiona form wyjściowych (linia DH-0120) oraz pokolenia M₅ rzepaku ozimego, które posłużyły do analiz pochodziły z samozapylenia 4000 pojedynczych. Analizowano je pod kątem zawartości glukozynolanów, sinapiny oraz kwasu fitynowego przy pomocy nieniszczącej metody NIRS. Ze względu na różną ilość nasion zebranych z poszczególnych pojedynczych analizy wykonywano na dwa sposoby tj. z adapterem (dodatkowym pierścieniem) jak i bez adaptera. Stwierdzono wyraźne zwiększenie zakresu zmienności badanych cech u mutantów, których wartości kształtowały się dla: glukozynolanów od 3,1 do 80,0 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$, sinapiny 4,7-11,8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ oraz kwasu fitynowego 11,4-16,1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Analizy kilkunastu form wyjściowych linii DH-0120 przy zastosowaniu dwóch metod wykazały różnice dla wybranych parametrów (np. zawartość glukozynolanów oznaczona z adapterem wynosiła 11,0 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$, a bez adaptera uzyskała wartość 8,0 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$). Takie badania wykonano również na kilkudziesięciu próbkach nasion mutantów stwierdzając podobne zależności przy zastosowaniu obu metod.

Słowa kluczowe: rzepak, mutanty, glukozynolany, sinapina, kwas fitynowy, NIRS

WSTĘP

W wysokorozwiniętych krajach Ameryki Północnej i Unii Europejskiej oraz Chinach obserwuje się tendencje wyraźnego zwiększania zainteresowania olejem rzepakowym ze szczególnym zwróceniem uwagi na jego jakość, która musi być inna w przypadku użycia do celów przemysłowych i żywienia zwierząt (olej hy-

drauliczny, biopaliwo, śruta rzepakowa), a inna do celów konsumpcyjnych (Jourden i in., 1996, Wojciechowski i Olejniczak, 1997). Wartość pokarmowa i przemysłowa nasion rzepaku zależy od zawartości oleju, białka i składników antyżywniowych (glukozynolany, sinapina i kwas fitynowy) (Naczk i in., 1998) oraz spektrum kwasów tłuszczowych. Optymalna zawartość glukozynolanów w nasionach, przyjmowana za nieszkodliwą u obecnie uprawianych odmian rzepaku kształtuje się w zakresie od 10-20 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$. Od kilku lat obserwuje się zwiększenie zainteresowania obniżaniem zawartości sinapiny (Wojciechowski i in., 1994, Velasco i Möllers, 1998, zum Felde, 2005), która obniża wartość paszową śruty rzepakowej. Wraz z przewidywanym w przyszłości zwiększeniem powierzchni uprawy rzepaku ozimego w Polsce nawet do około 1,2-1,5 mln. hektarów głównie dla produkcji proekologicznego źródła energii (biopaliwo), powstanie również problem zagospodarowania wartościowej śruty rzepakowej, która może być alternatywnym, w stosunku do soi źródłem białka w żywieniu zwierząt. W obrębie rodzaju *Brassica* istnieje duża zmienność zawartości sinapiny a tym samym stwarza to możliwość selekcji form o obniżonej zawartości tego składnika (Syed i in., 1993, zum Felde, 2005). Zmienność tą można jeszcze zwiększyć na drodze mutagenezy, podobnie jak to miało miejsce w przypadku zmiany składu kwasów tłuszczowych (Röbbelen 1990). Skuteczność mutagenezy w modyfikowaniu zawartości składników antyżywniowych jest w literaturze stosunkowo słabo udokumentowana (Olejniczak i in., 2003).

Potrzeba obniżenia zawartości sinapiny w śrucie rzepakowej wiąże się przede wszystkim z tym, że kury znoszące jaja o brązowej barwie skorupy nie posiadają enzymu rozkładającego sinapinę i w przypadku ich skarmiania śrutą tradycyjną skutkuje rybim odorem jaj (Wojciechowski i in. 1994). Kwas fitynowy w nasionach rzepaku wiąże makro- i mikroelementy (Ca, K, P Cu Zn, Mn i Fe), które są niezbędne do wzrostu i rozwoju roślin, a szczególnie do kiełkowania nasion. Są jednak niepożądane ze względów ekologicznych, ponieważ są nieprzyswajalne przez zwierzęta za wyjątkiem przeżuwaczy i przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska (Lott i in., 2000, Raboy, 2001).

W wielu pracach donoszono o możliwości obniżenia zawartości kwasu fitynowego przy udziale mutagenezy u jęczmienia jarego, kukurydzy i ryżu (Larson i in., 1998, 2000, Raboy i in., 1999). Przy czym uważa się, że metoda spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIRS) pozwala szybko i sprawnie analizować próbki nasion z dużych populacji roślin bez ich uszkodzenia.

Celem pracy była ocena zawartości składników antyżywniowych w nasionach form wyjściowych i mutantów pokolenia M₅. Analizy wykonano metodą NIRS z zastosowaniem adaptera i bez adapteru, po różnym czasie przechowywania nasion rzepaku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła populacja mutantów pokolenia M_5 otrzymana w wyniku traktowania linii DH-0120 dwoma mutagenami chemicznymi: N-nitrozo-N-metylo-mocznikiem (MNU) i azydkiem sodu (AS) o koncentracji 1,5 i 2,5 mM przez 3 godziny. Linie wyjściową DH 0-120 otrzymano kilkanaście lat temu z Zakładu Roślin Oleistych, IHAR Poznań, na której prowadzono hodowlę zachowawczą. Analizy biochemiczne wykonano przy użyciu spektrometru (NIRS, model 6500 NIR Inc., Silverspring, MD, USA). Spektra odbiciowe ($\log 1/R$) w zakresie od 400-500 nm mierzono przy interwale 2 nm. Każda próba zawierała około 300 mg nasion (bez adaptera) oraz 30 mg (z adapterem). Analizowano zawartość oleju, białka, glukozynolanów, sinapiny i kwasu fitynowego. Ogółem analizom poddano nasiona z 4 tys. mutantów pokolenia M_5 wyselekcjonowanych z populacji roślin M_4 w liczbie ok. 6,5 tys. i 15 form wyjściowych. Dodatkowo dla stwierdzenia dokładności pomiarów wybrane próbki nasion mutantów (100) analizowano bez adaptera w dwóch terminach (pierwszego dnia i po kolejnych 7 dniach przechowywania).

WYNIKI I DYSKUSJA

Analizowana populacja nasion mutantów pokolenia M_5 wykazała wyraźne zwiększenie zakresu zmienności badanych cech biochemicznych szczególnie takich jak glukozynolany, sinapina i kwas fitynowy, w porównaniu do homozygotycznej linii wyjściowej DH-0120, u której te cechy wykazywały małą zmienność (tab. 1).

Tabela 1. Zmienność w zawartości glukozynolanów (*gls*), sinapiny i kwasu fitynowego w nasionach mutantów rzepaku pokolenia M_5 oraz formy wyjściowej (linia DH-0120) analizowanych za pomocą metody NIRS bez adaptera

Table 1. Variability in glucosinolates (*gls*), sinapine and phytic acid content in seeds of oilseed rape mutants (M_5 generation) and control forms (line DH-0120) estimated by NIRS method without adapter

Genotyp Genotype	<i>gls</i> ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$)	Sinapina Sinapine ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Kwas fitynowy Phytic acid ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
DH-0120	$8,0 \pm 1,50$	$8,6 \pm 0,10$	$11,0 \pm 0,50$
Mutanty Mutants	3,1 – 80,0	4,7 – 11,8	11,4 – 16,1

Dla badanych mutantów największy zakres zmienności zaobserwowano w zawartości glukozynolanów, która wahała się od 3,1 do 80,0 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$. Krälling i in. (1990) analizując różne formy rzepaku ozimego stwierdzili dużą zmienność w zawartości glukozynolanów analizowanych tradycyjną metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Z kolei Renard i in. (1987) wykazali możliwość wykorzystania metody NIRS do oznaczania zawartości glukozynolanów w nasionach rzepaku.

Nieco później Thies (1991) wykazał możliwość wyselekcjonowania form rzepaku o obniżonej zawartości sinapiny oraz kwasu fitynowego. W ostatnich latach wykazano również bardzo dużą zmienność w zawartości sinapiny w obrębie badanych form rzepaku (Bouchereau i in., 1991, Krälling i in., 1991, Velasco i Möllers, 1998, Wojciechowski i in., 1994, zum Felde, 2005). Natomiast Olejniczak i in. (2003) wyselekcjonowali linie rzepaku o zróżnicowanej zawartości sinapiny w jednej z badanych populacji mutantów. Podobnie jak w przypadku dwóch wyżej wymienionych składników (glukozynolany i sinapina) tak i w przypadku kwasu fitynowego stwierdzono możliwość obniżenia jego zawartości poprzez mutagenезę w nasionach takich gatunków jak np. jęczmień, kukurydza i ryż (Larson i in., 1998, 2000, Raboy, 2001). Rzepak jest rośliną obcopolną i dlatego rośliny podczas kwitnienia muszą być izolowane, co wyraźnie pogarsza zawiązywanie nasion, a tym samym próby dostępne do analiz są mniejsze. Wykonane analizy form wyjściowych przy zastosowaniu metody NIRS z adapterem (30g nasion) i bez adaptera (300g nasion) wykazały wyraźne różnice w zawartości analizowanych składników w tych dwóch próbach. Ze względu na to, że piętnaście analizowanych form wyjściowych wykazywało podobną zawartość poszczególnych składników w tabeli 2 zamieszczono jedynie średnie dla populacji. Szczególnie dużą różnicę pomiędzy danymi otrzymanymi przy pomocy tych dwóch metod stwierdzono w zawartości kwasu fitynowego: odpowiednio 10,4 mg·g⁻¹ i 12,5 mg·g⁻¹ (tab. 2). Podobne różnice stwierdzono w zawartości sinapiny: 7,4 mg·g⁻¹ bez adaptera i 8,9 mg·g⁻¹ z adapterem oraz kwasu fitynowego: 10,4 mg·g⁻¹ bez adaptera i 12,5 mg·g⁻¹ z adapterem). W przypadku analizowanych nasion mutantów różnice w zawartości szacowanych składników przy zastosowaniu dwóch metod były większe, w porównaniu z linią wyjściową (tab. 3). Przy czym, pomiędzy nasionami z poszczególnych pojedynków były znacznie większe różnice, niż te jakie obserwowano dla form wyjściowych. Otrzymane wyniki z zastosowaniem dwóch metod analiz świadczą o tym, że dokładniejszą metodą analiz jest metoda bez adaptera bazująca na większej próbie nasion.

Tabela 2. Średnia zawartość glukozynolanów (gls), sinapiny i kwasu fitynowego w nasionach formy wyjściowej (linia DH-0120) analizowanych za pomocą metody NIRS z adapterem i bez adaptera (średnia z analizy nasion z 15 pojedynków linii DH-0120)

Table 2. Average content of glucosinolates (gls), sinapine and phytic acid in seeds of control forms (average from 15 samples of line DH-0120) estimated by NIRS method with and without adapter

Składniki – Compounds	NIRS + adapter	NIRS – adapter
gsl (μM·g ⁻¹)	8,0	11,0
Sinapina – Sinapine (mg·g ⁻¹)	7,4	8,9
Kwas fitynowy – Phytic acid (mg·g ⁻¹)	10,4	12,5

Tabela 3. Zmienność w zawartości glukozynolanów (gls), sinapiny i kwasu fitynowego w nasionach mutantów rzepaku pokolenia M₅ analizowanych metodą NIRS z adapterem i bez adaptera

Table 3. Variability in glucosinolates (gls), sinapine and phytic acid content in seeds of oilseed rape mutants (M_5 generation) estimated by NIRS method with and without adapter

Składniki – Compounds	NIRS + adapter	NIRS – adapter
gsl ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$)	6,1-6,7	3,1-7,7
Sinapina – Sinapine ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	4,7-8,9	6,7-11,8
Kwas fitynowy – Phytic acid ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	9,6-11,4	11,3-13,8

Analizy związków antyżywniowych (glukozynolany, sinapina i kwas fitynowy) wykonane w różnych terminach od zbioru nasion (bezpośrednio i tydzień później) nie wykazały różnic (tab. 4).

Tabela 4. Zmienność w zawartości glukozynolanów (gls), sinapiny i kwasu fitynowego w nasionach mutantów rzepaku pokolenia M_5 analizowanych metodą NIRS bez adaptera w zależności od terminu wykonania analizy (bezpośrednio i 7 dni po zbiorze nasion)**Table 4.** Variability in glucosinolates (gls), sinapine and phytic acid content in seeds of oilseed rape mutants (M_5 generation) estimated by NIRS method without adapter depending on the term of analysis (directly and 7 days after harvest)

Składniki – Compounds	NIRS – adapter	
	I pomiar – score I	II pomiar – score II
gsl ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$)	6,6-7,3	6,1-7,7
Sinapina – Sinapine ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	5,0-7,3	4,7- 8,9
Kwas fitynowy – Phytic acid ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	9,6-11,3	9,6-11,4

WNIOSKI

1. Analizy związków antyżywniowych (glukozynolany, sinapina i kwas fitynowy) w nasionach homozygotycznej linii DH-0120 i mutantów pokolenia M_5 wykazały zróżnicowanie w zawartości tych składników, przy czym dokładniejsze wyniki otrzymano z analiz metodą NIRS bez adaptera w porównaniu z metodą NIRS z adapterem.

2. Wiek przechowywanych nasion nie wpływał znacząco na zawartość analizowanych składników.

PIŚMIENNICTWO

- Bouchereau., A., Hamelin J., Lamour J., Renard M. and Larther F. 1991. Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied Genera. *Phytochemistry* 30, 1873-1881.
- Jourden C., Simoneaux d., Renard M. 1996. Selection of pollen for linolenic acid content in rape-seed, *Brassica napus* L., *Plant Breeding*, 115, 11-15.

- Krälling K., Röbbelen G., Thies W., Herrmann M., Ahmadi M.R. 1990. Variation of seed glucosinolate in lines of *Brassica napus*. Plant Breeding, 105, 33-39.
- Krälling K., Röbbelen G., Thies., Kolling K., Röbbelen G. and Thies W. 1991. Genetic variation of the content of sinapoyl esters in seeds of rape, *B. napus*. Plant Breeding 106, 254-257.
- Larson S.R., Young K.A., Cook A., Blake T.K., Raboy V. 1998. Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. Theor Appl Genet, 97, 141-146.
- Larson S.R., Young K.A., Raboy V. 2000. Isolation and genetic mapping of no-lethal rice (*Oriza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. Crop Sci., 40, 1397-1405.
- Lott J., N., A., Oekenden I., Raboy V., Batten G.D. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits a global estimate. Seed Science Research 10, 11-33.
- Naczek M., Aramowicz A., Sullivan A., Shahidi F. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseeds/canola: a review. Food Chemistry, 62, 489-502.
- Olejniczak J., Wojciechowski A., zum Felde T., Möllers C. 2003. Możliwości wykorzystania spektrometrii odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIRS) dla analiz cech jakościowych i ilościowych nasion rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) Acta Agrophysica 83, 155-162.
- Raboy V., Dickinson D.B., Neuffer M.G. 1999. A survey maize kernel mutants for variation in phytic acid. Maydica, 35, 385-390.
- Raboy V. 2001. Seeds for a better future: "Low phytate" grains help to overcome malnutrition and reduced pollution. Trends in Plant Sciences, 6(10), 458-462.
- Renard M., Bernard C., Deschamps M., Furtoss V., Lila M., Quinsac A., Regnier J.M., Ribaillet D. 1987. Glucosinolate analysis in whole rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. In: J.P. Wathélet (ed), Glucosinolates in rapeseed. Analytical aspects, Martinus Nijhof, Dordrecht, The Netherlands, 173-176.
- Röbbelen G. 1990. Mutation breeding for quality improvement. A case study for oilseed crops. Mutation Breeding Review, n°6. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria.
- Syed A.S., Ali I., Rahman K. 1993. Improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) for agronomie and quality characters through induced mutations and hybridization. Proc. of a Final Research Co-ordination of an FAO/IAEA, Vienna, 11-15.
- Thies W. 1991. Determination of the phytic acid and sinapic acid ester in seeds of rapeseed and selection of genotypes with reduced concentration of these compounds. Fat. Sci. Technol. 93, 49-52.
- Velasco L., Möllers C. 1998. Nondestructive assessment of sinapine acid esters in *Brassica* species: n. Evaluation germplasm and identification phenotype with reduce level. Crop Sci., 38, 1650-1654.
- Wojciechowski A., Kott L., Beversdorf W. 1994. Zawartość sinapiny w haploidalnych zarodkach rzepaku (*Brassica napus*) otrzymanych w kulturach izolowanych mikrospor. Rośliny Oleiste, XV, 105-110.
- Wojciechowski A., Olejniczak J. 1997. Możliwości modyfikacji składu kwasów tłuszczowych u rzepaku. Hodowla Roślin, Materiały I Krajowej Konferencji, Poznań, 19-20.11: 339-344.
- zum Felde T. 2005. Genetische Variation und Vererbung von Sinapinsäure-Verbindungen im Raps (*Brassica napus* L.). Manuscript I, 1-29, Universität w Göttingen.

SELECTION OF WINTER OILSEED RAPE MUTANTS
(*BRASSICA NAPUS* L.) WITH REDUCED CONTENT

OF ANTINUTRITIONAL COMPOUNDS BY THE USE
OF NEAR-INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY (NIRS)

Jan Olejniczak¹, Małgorzata Adamczak¹, Andrzej Wojciechowski²

¹Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
e-mail: jole@igr.poznan.pl

²Department of Genetics and Plant Breeding, University of Agriculture
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-112 Poznań

Abstract. Growing interest in rapeseed is connected with big possibilities of its use both for industrial and consumption purposes. The quality of rapeseed oil and meal depends on e.g. on the content of antinutritional compounds in the seeds (for example glucosinolates, sinapine, phytic acid). One of the most effective methods for increasing the variability of traits affecting the quality of rapeseed products is mutagenesis. The winter oilseed rape seeds of initial forms (line DH-0120) and M₅ generation were collected from 4000 M₅ plants after self-pollination. These seeds were analysed for glucosinolate, sinapine and phytic acid content by the use of NIRS method. Because of lower amount of seeds which can be obtained from self-pollinated plants compared to cross-pollinated ones, two NIRS methods were used, i.e. with (additional ring) and without adapter. Mutants showed great increase of variability of analysed traits. For glucosinolates content the values ranged from 3.1 to 80.0 $\mu\text{M g}^{-1}$, sinapine 4.7-11.8 mg g^{-1} and phytic acid 11.4-16.1 mg g^{-1} . Two methods of analyses of several line DH-120 initial forms showed differences between the results obtained by NIRS with adapter compared to the results obtained by NIRS without adapter (e.g. for glucosinolates the results were 8.0 $\mu\text{M g}^{-1}$ and 11.0 $\mu\text{M g}^{-1}$, respectively). Similar analyses were made with several seed mutant samples and they also showed differences between the data obtained from these two NIRS methods.

Key words: rapeseed, mutants, glucosinolates, sinapine, phytic acid, NIRS