

ELŻBIETA ADAMSKA¹
TERESA CEGIELSKA-TARAS²
LAURENCJA SZALA²
KRYSTYNA CZERNIK-KOŁODZIEJ²

¹ Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu

Analiza genetyczna zawartości kwasów tłuszczowych w liniach DH rzepaku ozimego

The genetic analysis of oilseed rape fatty acids composition on the basis of field experiments with doubled haploid lines

Doświadczenia polowe przeprowadzono w dwóch środowiskach na Polu Doświadczalnym Zakładu Roślin Oleistych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu w sezonie 1998–1999 oraz w Stacji Doświadczalnej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerekwicy w sezonie 1999–2000. Każde z doświadczeń założono w układzie całkowicie losowym w trzech powtórzeniach. Obiektami były 32 linie podwojonych haploidów (linie DH) wyprowadzone metodą izolowanych mikrospor z pokolenia F₁ mieszańca DH 0-120 × DH C-1041, mieszańce pokolenia F₁ i F₂ (w pierwszym roku badań), F₂ i F₃ (w drugim roku badań) oraz ich formy rodzicielskie. Badano w oleju nasion zawartość następujących kwasów tłuszczowych: kwasu palmitynowego (C16 : 0), kwasu stearynowego (C18 : 0), oleinowego (C18 : 1), linolowego (C18 : 2) i linolenowego (C18 : 3). W wyniku przeprowadzonej dwuczynnikowej analizy wariancji stwierdzono istotne różnice między latami oraz między badanymi genotypami. Natomiast nie wystąpiła dla żadnego kwasu tłuszczowego istotna interakcja genotypy × lata. Na podstawie linii DH oraz odpowiednich pokoleń segregujących oszacowano parametry genetyczne określające efekty addytywnego działania genów [d], dominacji [h] i nieallelicznej interakcji *loci* homozygotycznych [i] i heterozygotycznych [l] dla zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w każdym roku badań oraz dla obu lat łącznie. Praca stanowi także przykład na wyznaczanie średnich dla dwóch lat badań ocen parametrów genetycznych z wykorzystaniem mieszańców pokolenia F₁ i F₂ w pierwszym roku badań i F₂ i F₃ w drugim roku badań.

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe, linie DH, parametry genetyczne, rzepak

The field trials were carried out at two sites: Plant Breeding and Acclimatization Institute experimental field in Poznań in the season 1998–1999 and the Experimental Station Institute of Plant Genetics Polish Academy of Science in Cerekwica in the season 1999–2000. Field experiments were conducted in randomized blocks, in three replications. Thirty-two lines of doubled haploid (DH) winter oilseed rape were obtained from F₁ hybrid DH-O120 × DH- C-1041 using isolated microspore culture. Parental forms and F₁ hybrids (in the first year) and F₂ and F₃ hybrids (in the second year) were studied. A content of the following fatty acids: palmitic acid (C16 : 0), stearic acid (C18 : 0), oleic acid (C18 : 1), linoleic acid (C18 : 2), linolenic acid (C18 : 3) was determined. Two-factor analysis of variance

showed significant differences between the years of the study and genotypes. However the interaction genotypes $\times$ years was not significant with any of the acids. Based on DH lines and respective segregating generations, genetic parameters describing the effects of: additive genes (d), dominant genes (h) and non allelic interaction of homozygous (i) and, heterozygous (l) loci were estimated. The parameters were calculated for a content of fatty acids in each year (period) of the study and for two years in total. This work provides the example of how to determinate the means for genetic parameters in a two-year estimation period with the use of F₁ and F₂ hybrids in the first year and F₂ and F₃ hybrids in the second year.

Key words: DH lines, fatty acids, genetic parameters, oilseed rape

WSTĘP

Rzepak ozimy (*Brassica napus* L.) jest najważniejszą rośliną oleistą w strefie klimatu umiarkowanego. Na świecie olej rzepakowy w 80% wykorzystywany jest na cele konsumpcyjne. Pozostała część zużywana jest na cele przemysłowe. Według Krzymańskiego (2000) jednym z aktualnych zadań badawczych i hodowlanych jest lepsze dostosowanie jakości odmian rzepaku ozimego dla odbiorców tego surowca, uwzględniające różne zastosowanie oleju rzepaku. Szczególnie pożądane są genotypy z dużą zawartością kwasu oleinowego np. do produkcji oleju napędowego.

Standardowy skład oleju rzepakowego to: 4,5% kwasu palmitynowego (C_{16:0}), 1,5% stearynowego (C_{18:0}), 60% kwasu oleinowego (C_{18:1}), 20% kwasu linolowego (C_{18:2}) oraz 10% kwasu linolenowego (C_{18:3}).

W hodowli rzepaku przy wykorzystaniu form haploidalnych, linie podwojonych haploidów (DH) wyprowadza się najczęściej z mieszańców pokolenia F₁. Linie te mogą stanowić równocześnie interesujący z naukowego punktu widzenia materiał, pozwalający na uzyskanie informacji o efektach addytywnego działania genów i epistazy loci w stanie homozygotycznym. Dla uzyskania informacji o efektach dominowania i współdziałania genów dominujących konieczne jest włączenie do doświadczeń dwóch następujących po sobie pokoleń segregujących. Z ekonomicznego punktu widzenia korzystne jest przeprowadzanie eksperymentów w pierwszym roku badań z udziałem mieszańców pokolenia F₁ i F₂. Liczba nasion uzyskanych z generacji pokolenia F₂ i F₃ pozwala, bowiem na powtórzenie w kolejnym roku doświadczenia bez konieczności ponoszenia kosztów związanych z produkcją nasion pokolenia F₁. Praca zawiera wyniki analizy statystyczno-genetycznej dotyczącej parametrów genetycznych wyznaczonych dla różnych kwasów tłuszczowych rzepaku. Celem badań była ocena efektów działania genów kontrolujących zawartość kwasów tłuszczowych w oleju nasion, jak również wyznaczenie liczby genów (grup genów) kontrolujących zawartość tych kwasów. Praca stanowi równocześnie przykład estymacji i testowania średnich ocen parametrów genetycznych na podstawie doświadczeń dwuletnich obejmujących linie DH oraz mieszańce pokolenia F₁ i F₂ (w pierwszym roku badań) oraz F₂ i F₃ (w drugim roku badań).

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na polach doświadczalnych IHAR w Poznaniu w sezonie 1998–1999 oraz IGR PAN w Cerekwicy w sezonie 1999–2000. W obu

doświadczeniach materiał do badań stanowiły 32 linie podwojonych haploidów (DH) rzepaku ozimego, otrzymane metodą izolowanych mikrospor z mieszańców pokolenia F_1 (DH 0-120 $\times$ C-1041) oraz ich formy wyjściowe (Cegielska-Taras, Szała, 1997). W doświadczeniu pierwszym brały także udział mieszańce pokolenia F_1 i F_2 , natomiast drugim mieszańce pokolenia F_2 i F_3 . Sposób przeprowadzenia doświadczeń podano w pracy Adamskiej i wsp. (2001). Skład kwasów tłuszczowych w oleju nasion oznaczano metodą chromatografii gazowej (Byczyńska, Krzymański, 1969). Określono procentową zawartość pięciu kwasów tłuszczowych: palmitynowego (C16 : 0), stearynowego, (C18 : 0), oleinowego (C18 : 1), linolowego (C18 : 2), i linolenowego (C18 : 3).

Dane uzyskane z doświadczeń posłużyły do przeprowadzenia obliczeń statystycznych dotyczących efektów addytywnego działania genów [d], dominacji [h] i nieallelicznej interakcji *loci* homozygotycznych [i] oraz heterozygotycznych [l]. Z uwagi na to, że doświadczenie w roku pierwszym obejmowało 32 linie DH oraz mieszańce F_1 i F_2 , oceny parametrów genetycznych wyznaczono za pomocą wzorów podanych w pracy Surma i wsp. (1984). Ponieważ w drugim roku badań uczestniczyły te same linie DH oraz mieszańce pokolenia F_2 i F_3 , dla oceny parametrów wykorzystano metodę opracowaną przez Surmę i wsp. (1997) Aby przeprowadzić pewnego rodzaju syntezę czyli wyznaczyć parametry genetyczne na podstawie obu doświadczeń (różniących się jednym obiektem) konieczne było zastosowanie transformacji umożliwiającej uzupełnienie brakujących obserwacji. Możliwe było albo znalezienie „brakujących” obserwacji mieszańców F_3 w pierwszym roku badań na podstawie pokoleń F_1 i F_2 oraz linii DH, albo też znalezienie „brakujących” obserwacji mieszańców pokolenia F_1 w doświadczeniu z roku drugiego na podstawie obserwacji tej cechy u mieszańców pokolenia F_2 i F_3 . W naszych obliczeniach dokonaliśmy uzupełnienia obserwacji mieszańców pokolenia F_3 w pierwszym roku badań według wzoru:

$$F_3 = \frac{6F_2 + 3L - F_1}{8} \quad (1)$$

Liczbę genów (grup genów) oszacowano metodą podaną w pracy Adamskiego i wsp. (1987). Zastosowane przekształcenie umożliwiło wykonanie analizy wariancji łącznej dla obu lat oraz znalezienie ocen wspomnianych wyżej parametrów genetycznych i przeprowadzenia testowania ich istotności.

WYNIKI I DYSKUSJA

Średnie zawartości badanych kwasów tłuszczowych w oleju nasion dla mieszańców pokolenia F_1 , F_2 , F_3 , linii DH oraz linii DH o wartościach ekstremalnych i oceny parametrów genetycznych przedstawiono w tabelach 1–5.

Tabela 1

Średnie pokoleń mieszańcowych i linii DH oraz oceny i wyniki testowania parametrów genetycznych dla zawartości kwasu palmitynowego (C16 : 0)
Mean values for hybrids, DH lines and estimates and results of testing genetic parameters for palmitic acid (C16 : 0) content

Pokolenia mieszańcowe i linie DH Hybrids and DH lines	Lata Years		
	1999	2000	Średnia Mean
F ₁	4,90	—	—
F ₂	4,96	5,20	5,08
F ₃	(4,96)	5,33	5,14
L _{max}	5,13	5,31	5,22
L _{min}	4,75	4,84	4,80
L _{mean}	4,94	5,23	5,09
Parametry genetyczne Genetic parameters			
[d]	0,183**	0,235**	0,209**
[h]	0,123	1,572	0,848
[i]	0,003	-0,032	-0,014
[l]	-0,147	2,088	1,476
Liczba genów Number of genes	3	4	4

* — Istotne na poziomie p = 0,05

* — Significance at p = 0.05

** — Istotne na poziomie p = 0,01

** — Significance at p = 0.01

(4,96) — Wartość uzyskana ze wzoru (1)

(4.96) — Value obtained from formula (1)

Tabela 2

Średnie pokoleń mieszańcowych i linii DH oraz oceny i wyniki testowania parametrów genetycznych dla zawartości kwasu stearynowego (C18 : 0)
Mean values for hybrids and DH lines, and estimates and results of testing genetic parameters for stearic acid (C18 : 0) content

Pokolenia mieszańcowe i linie DH Hybrids and DH lines	Lata Years		
	1999	2000	Średnia Mean
F ₁	1,56	—	—
F ₂	1,40	1,46	1,43
F ₃	(1,43)	1,20	1,31
L _{max}	1,62	1,60	1,61
L _{min}	1,22	1,04	1,13
L _{mean}	1,53	1,37	1,45
Parametry genetyczne Genetic parameters			
[d]	0,201**	0,266**	0,234**
[h]	-0,489	-1,614	-1,052
[i]	-0,099**	-0,063	-0,081**
[l]	0,475	3,574	2,841
Liczba genów Number of genes	1	1	1

* — Istotne na poziomie p = 0,05

* — Significance at p = 0.05

** — Istotne na poziomie p = 0,01

** — Significance at p = 0.01

(1,43) — Wartość uzyskana ze wzoru (1)

(1.43) — Value obtained from formula (1)

Tabela 3

Średnie pokoleń mieszańcowych i linii DH oraz oceny i wyniki testowania parametrów genetycznych dla zawartości kwasu oleinowego (C18 : 1)
Mean values for hybrids and DH lines and estimates and results of testing genetic parameters for oleic acid (C18 : 1) content

Pokolenia mieszańcowe i linie DH Hybrids and DH lines	Lata Years		
	1999	2000	Średnia Mean
F ₁	63,4	—	—
F ₂	61,9	58,7	60,3
F ₃	(62,0)	59,3	60,7
L _{max}	66,2	63,4	64,8
L _{min}	60,7	57,4	59,0
L _{mean}	62,4	59,2	60,8
Parametry genetyczne Genetic parameters			
[d]	2,71**	2,98**	2,851**
[h]	-2,98	2,01	-0,487
[i]	0,98*	1,20*	1,019**
[l]	3,94	-6,05	-1,057
Liczba genów Number of genes	3	3	3

* — Istotne na poziomie p= 0,05

* — Significance at p = 0.05

** — Istotne na poziomie p= 0,01

** — Significance at p = 0.01

(62,0) — Wartość uzyskana ze wzoru (1)

(62.0) — Value obtained from formula (1)

Tabela 4

Średnie pokoleń mieszańcowych i linii DH oraz oceny i wyniki testowania parametrów genetycznych dla zawartości kwasu linolowego (C18 : 2)
Mean values for hybrids and DH lines and estimates and results of testing genetic parameters for linoleic acid (C18 : 2) content

Pokolenia mieszańcowe i linie DH Hybrids and DH lines	Lata Years		
	1999	2000	Średnia Mean
F ₁	18,5	—	—
F ₂	19,8	22,8	21,3
F ₃	(19,8)	21,5	20,6
L _{max}	20,7	23,7	22,2
L _{min}	18,2	20,5	19,3
L _{mean}	19,3	22,0	20,6
Parametry genetyczne Genetic parameters			
[d]	1,249**	1,616**	1,432**
[h]	2,715	-6,171	-1,728
[i]	0,205	0,060	0,151
[l]	-3,513	15,516	6,002
Liczba genów Number of genes	3	4	3

* — Istotne na poziomie p = 0,05

* — Significance at p = 0.05

** — Istotne na poziomie p= 0,01

** — Significance at p = 0.01

(19,8) — Wartość uzyskana ze wzoru (1)

(19.8) — value obtained from formula (1)

Tabela 5

Średnie pokoleń mieszańcowych i linii DH oraz oceny i wyniki testowania parametrów genetycznych dla zawartości kwasu linolenowego (C18 : 3)

Mean values for hybrids and DH lines and estimates and results of testing genetic parameters for linolenic acid (C18 : 3) content

Pokolenia mieszańcowe i linie DH Hybrids and DH lines	Lata Years		
	1999	2000	Średnia Mean
F ₁	10,3	—	—
F ₂	10,3	11,1	10,7
F ₃	(10,5)	11,2	10,9
L _{max}	11,3	12,4	11,8
L _{min}	9,7	10,2	9,9
L _{mean}	10,5	11,4	10,9
Parametry genetyczne Genetic parameters			
[d]	0,833**	1,094**	0,963**
[h]	0,573	-0,841	-0,134
[i]	0,000	-0,056	-0,028
[l]	-1,812	0,233	-0,790
Liczba genów Number of genes	1	2	2

* — Istotne na poziomie $p = 0,05$

* — Significance at $p = 0.05$

** — Istotne na poziomie $p = 0,01$

** — Significance at $p = 0.01$

(10,5) — Wartość uzyskana ze wzoru (1)

(10.5) — Value obtained from formula (1)

Efekty addytywnego działania genów obliczone zarówno dla każdego roku oddzielnie, jak i średnio dla obu lat okazały się istotne dla zawartości wszystkich badanych kwasów tłuszczowych. W przypadku badanych kwasów uwagę zwraca brak dominowania oraz efektów związanych z niealleliczną interakcją *loci* w stanie heterozygotycznym (tab. 1–5).

Daje się jednak zauważyć pewien, aczkolwiek nieistotny wpływ warunków środowiska na ujawnianie się efektów związanych ze stanem heterozygotycznym *loci*. Dowodem na to są uzyskane stosunkowo wysokie co do bezwzględnej wartości oceny parametru [h] i [l] dla kwasu oleinowego i linolowego (szczególnie w 2000 roku), wskazujące zarazem na różny w poszczególnych latach kierunek działania genów. Nie można więc wykluczyć, iż dla tych kwasów w innych warunkach środowiska efekty te mogą okazać się istotne. Interakcja *loci* homozygotycznych wywierała istotny wpływ na ekspresję zawartości kwasu stearynowego w kierunku zmniejszenia zawartości tego kwasu w oleju nasion. Świadczy o tym zarówno ujemna średnia wartość parametru [i], oszacowana na podstawie dwuletniego doświadczenia jak i ocena uzyskana na podstawie wyników z eksperymentu przeprowadzonego w 1999 roku. Z zamieszczonych w tabeli 3 ocen parametrów genetycznych dla zawartości kwasu oleinowego wynika, iż na ekspresję tej cechy, oprócz działania genów addytywnych, istotny wpływ miała interakcja genów homozygotycznych w kierunku zwiększenia ilości tego kwasu w nasionach.

Liczba genów lub grup genów ściśle ze sobą sprzężonych kontrolujących zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepaku, którymi różniły się badane formy rodzicielskie wynosiła jeden dla kwasu stearynowego, cztery dla palmitynowego trzy dla linolowego i oleinowego oraz dwa dla linolenowego.

W ocenie jakości oleju w pierwszym rzędzie bierze się pod uwagę skład kwasów tłuszczowych. Na wystąpienie różnic w zawartości poszczególnych nienasyconych kwasów tłuszczowych oprócz czynników genetycznych mają wpływ warunki środowiska (wilgotnościowo-termiczne oraz agrotechniczne takie jak termin siewu, nawożenie) (Kotecki i in., 2001; Spasibionek i in., 1998), chociaż Schierholt i Becker, (2001) u mutantów wysoko- i niskooleinowych wykazali odziedziczalność ($h^2 = 0,99$) i brak istotnego wpływu lokalizacji na zawartość kwasu oleinowego.

W prezentowanej pracy pokazano możliwość oszacowania średnich ocen parametrów genetycznych z dwóch lat badań w przypadku, gdy w jednym z doświadczeń biorą udział mieszańce pokolenia F_1 i F_2 , natomiast w drugim F_2 i F_3 . Znajomość średnich efektów działania genów w znacznym stopniu ułatwia przeprowadzenie wnioskowania o sposobie działania genów kontrolujących daną cechę ilościową. W prowadzonych przez nas badaniach wyznaczenie średniej oceny wartości parametru na podstawie wyników uzyskanych z dwóch doświadczeń i odpowiednie testowanie istotności tego parametru pozwoliły w przypadku zawartości kwasu stearynowego (C18 : 0) jednoznacznie stwierdzić o wpływie nieallelicznej interakcji na ekspresję tej cechy.

Uzyskane wyniki wskazują, iż z dużym prawdopodobieństwem możliwe będzie częściowe poprawienie spektrum zawartości badanych kwasów tłuszczowych w oleju rzepaku zgodnie z oczekiwaniami przemysłu. Szczególnie widoczne jest to w przypadku kwasu oleinowego, gdzie efekty związane z addytywnym działaniem genów i współdziałaniem homozygotycznych *loci* świadczą o szansie wyhodowania nowych form rzepaku o podwyższonej zawartości tego kwasu w oleju rzepaku i uzyskanie dostosowanego dla produkcji biopaliw surowca. Z kolei jednak z analizowanych mieszańców trudno będzie wyselekcjonować formy o podwyższonej zawartości kwasu stearynowego. Współdziałanie nieallelicznych *loci* w stanie homozygotycznym powoduje bowiem spadek zawartości tego kwasu w oleju rzepaku. Potwierdzeniem są wcześniejsze badania Adamskiej i wsp. 2001, dotyczące oceny badanych linii rzepaku ozimego pod względem wybranych cech struktury plonu i zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, w których autorom nie udało się uzyskać ani linii transgresyjnych ani też linii przewyższających pod względem zawartości tego kwasu odmianę wzorcową Kana. Z uwagi na istotne efekty addytywnego działania genów dla zawartości kwasu linolowego i linolenowego możliwe wydaje się wyselekcjonowanie form zarówno o obniżonej, jak i podwyższonej zawartości tego kwasu w oleju rzepaku.

WNIOSKI

1. Efekty addytywnego działania genów obliczone dla każdego roku oraz dwóch lat łącznie były istotne dla zawartości wszystkich badanych kwasów tłuszczowych.
2. U żadnego z badanych kwasów nie wystąpiły efekty związane z dominowaniem oraz niealleliczną interakcją *loci* w stanie heterozygotycznym.
3. Liczba genów lub grup genów ściśle ze sobą sprzężonych którymi różniły się badane formy rodzicielskie pod względem zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych wynosiła od 1 do 4.

LITERATURA

- Adamska E., Szała L., Kołodziej K., Cegielska T. 2001. Ocena linii DH rzepaku ozimego pod względem wybranych cech na podstawie doświadczeń polowych przeprowadzonych w dwóch środowiskach. *Rośliny Oleiste XXII*: 13 — 25.
- Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M. 1987. Ocena czynników efektywnych na podstawie linii autopoloidalnych. *Siedemnaste Colloquium Metodologiczne z Agrobiometrii*, Lublin, PAN: 247 — 256.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne* 13: 108 — 114.
- Cegielska-Taras T., Szała L. 1997. Regeneracja roślin z mikrosporowych zarodków rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste XVIII*: 21 — 30.
- Kotecki A., Malarz W., Kozak M., Aniołowski K. 2001. Wpływ nawożenia azotem na skład chemiczny pięciu odmian rzepaku jarego. *Rośliny Oleiste XXII*: 81 — 89.
- Krzymański J. 2000. Perspektywy badań nad rzepakiem i jego hodowlą. *Rośliny Oleiste XXI*: 7 — 14.
- Schierholt A., Becker H. C. 2001. Environmental variability and heritability of high oleic acid content in winter oilseed rape. *Plant Breeding* 120: 63 — 66.
- Spasibonek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1998. Wpływ środowiska na zmiany składu kwasów tłuszczowych w olejach mutantów 1207 rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste XIX*: 627 — 632.
- Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z. 1984. The use of doubled haploids lines for estimation of genetic parameters. *Genet. Pol.* 25: 27 — 32.
- Surma M., Kaczmarek Z., Adamski T. 1997. Estimation of genetic parameters based on doubled haploids and early generations. In: *Advances in Biometrical Genetics*. (Edited by P. Krajewski and Z. Kaczmarek): 281 — 285.