

DIE VERERBUNG VON GLUCOSINOLATGEHALT UND-MUSTER
BEI DER ARTKREUZUNG BRASSICA OLERACEA X
BRASSICA CAPESTRIS

M. R. Ahmadi (1), G. Röbbelen (2), W. Thies (2)
Seed and Plant Improvement Institute, Karadj IRAN
Plant Breeding Institute, Von Siebold str. 8
3400 Goettingen , GERMANY

EINLEITUNG

In den letzten zwei Jahrzehnten beruhte die Züchtung glukosinolatärmer Rapsorten fast ausschliesslich auf der polnischen Sommerapsorte ' Bronowski ', in der alle vorkommenden Glukosinolate in etwa gleichem Verhältnis auf rund ein zehntel des üblichen Gehaltes reduziert sind (Downey et al., 1969, Busch und Röbbelen, 1981). Aus diesem Grunde erschien es von besonderem Interesse zu versuchen neuartige Rapslinien mit niedrigerem Glukosinolatgehalt durch Kreuzung ausgewählter *B.oleracea*- und *B.campestris* Formen herzustellen (Gland 1980, Kalasa Balicka 1985). Parallel zu den züchterischen Arbeiten wurden die analytischen Methoden zur GSL-Bestimmung fortwährend weiter entwickelt (Thies 1988, 1990). Früher wurden von Sang und Truscott (1984) Nachweisverfahren von GSL'en einschliesslich Indol GSL'en mittels HPLC beschrieben. In dieser Arbeit wurde versucht durch Vergleich des Mittels HPLC bestimmten GSL - Gehaltes der Ausgangseltern mit dem GSL - Gehalt der aus ihrer Kreuzung entstandenen reyn Linien auf dessen Vererbung zu schliessen.

Material und Methoden

Pflanzliches Material : In den Jahren 1986-87 wurden 86 synthetischen Rapslinien in Mikroparzellen aufgezogen und deren Selbstungssamen (3 - 5 Pflanzen/Parzelle) Mittels HPLC auf GSL-Gehalt und-Muster geprüft. 39 *B.oleracea* - und 29 *B.campestris* Formen, die als Ausgangseltern dieser synthetischen Rapslinien gedient hatten, wurden jeweils mit 12 Pflanzen im Gewächshaus aufgezogen. Der GSL - Gehalt und - Muster ihrer Selbstungssamen wurde ebenfalls bestimmt und mit den Werten ihrer Kreuzungsnachkommenschaften verglichen.

Analytische Methoden : 200 mg Saatgut wurden in einer IKA-Mühle fein gemahlen. Für GSL Extraktion wurden die Proben 10 Minuten im Wasserbad (75° c) bei Zugabe von 2 ml heissem 70/30 Methanol/ Wasser-Gemisch und 200 µg 16 mol Glucotropaeolin/ 1 Wasser als interner Standard behandelt. Zentrifugiert wurde 4 Minuten bei 4-5000 rpm. Danach wurden die Röhren bei Zugabe von heissem Methanol/Wasser - Gemisch (2ml 10/90) ins Wasserbad zurück gestellt und die Extraktion wiederholt. 500 µl Probenlösung aus dem Überstand wurde auf eine 20 mg Sephadexsäule auf gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 1 ml 40 mM Natriumacetat-Essigsäurepuffer pH 4,0 gewaschen. Desulfatierung wurde bei Zugabe von 75 µl gereinigter H-1-Sulphatase-Stammlösung , bei 39° c und 16 Stunden Dauer, erreicht. Elution der Proben fand mit 3 x 0,5 ml hochreinem Wasser statt. Nach Filtrieren wurde 70 µl von Proben für HPLC - Analyse verwendet.

HPLC - Gerät : Hochdruckgradientensystem der Firma Millipore/ Waters GmbH, Eschborn, bestehend aus zwei 510 Pumpen, dem automatischen Probengeber 710b, dem Integrator Data Module 730 , dem Systemcontroller 721 und dem UV Detektor 441. HPLC- Säule : Nucleosil C18, 5 µm, 200 x 4,0 mm, Macherey & Nagel, Düren. HPLC- Parameter : Für die Trennung aller vorkommenden Glukosinolate mussten zwei verschiedene Lösungsmittelgradienten bei zwei verschiedenen Temperaturen eingesetzt werden (Buchner , 1988).

Ergebnisse

Der Gesamtglucosinolatgehalt der Kohlformen variierte zwischen 101,2 bis 333,0 μ mol (Tab. 1). Es wurden 16 verschiedene GSLe in den Kohlsamen erfasst. Der Sinigrin stellte in den meisten Proben das Haupt- GSL dar. Aufgrund des Syntheseweges und des chemischen Charakters werden unter anderem Alkenyl-, Schwefel - und Indol- GSLe unterschieden. Schwefel - und die Alkenyl GSLe wiesen eine hohe, die Indole dagegen eine relativ niedrige Variationsbreite auf. Geringste Alkenylgehalte wurde bei den Gongyloides Formen festgestellt. Der Gesamt - GSL - Gehalt der *B.campestris* Formen variierte zwischen 33,7 μ mol bei oleifera- und 261,0 μ mol bei rapifera- Formen (Tabelle 1). Sie hatten im Mittel geringere GSL- Gehalte als die Kohlformen. Bei den pekinensis- und chinensis Formen stellt das Gluconapin das Haupt - GSL dar. Das GSL-Muster der *B.campestris* Oleifera Formen unterschied sich von dem der pekinensis Formen durch einen relativ hohen Progoitringehalt, der bis 49% des Gesamt - GSL - Gehalts erreichte. Die extremsten 4 OH-Werte wurden mit 5,2- und 22,0 μ mol bei pekinessis bzw. rapifera Formen festgestellt. Trotz stark abweichender GSL - Muster der *B. oleracea*- und *B.campestris* Formen wiesen die aus ihrer Kombination entstandenen resyn - Linien relativ einheitliche GSL - Muster auf . In Abbildung(1) ist das GSL - Muster von einer resyn - Linie im vergleich zu den jeweiligen Elternformen dargestellt. .

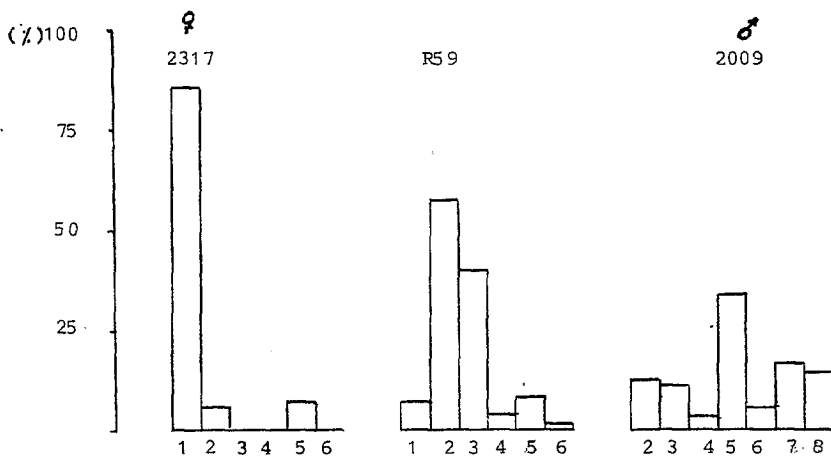


Abb. 1 : Gehalt an Einzelglucosinolaten in Prozent des Gesamtglucosinolatgehalts von Samen einer resyn-Form im Vergleich zu ihren Elternformen.

- 1 = SIN
- 2 = PRO
- 3 = GNA
- 4 = GBN
- 5 = 4OH
- 6 = ALY
- 7 = ERU
- 8 = NAS

Tabell 1 . Variationsbreite von prozentualen Anteile der Alkenyl - , Indol- und Schwefel GSLe und GSL - Gehalt von *B.oleracea*- und *B.campestris* Unterarten

botanische Bezeichnung	Anzahl Sorten (n)	Variationsbreits			GSL μmol/g entf.Mehl
		Alkenyle	Indole	S-GSLe	
<u><i>B.oleracea</i></u>					
acephala	6	39,0-88,0	7,8-12,1	2,4-52,7	101,2-266,0
alboglabra	2	85,8-97,0	3,0-6,6	4,0-9,3	257,0-305,0
capitata	13	16,9-91,3	3,6-14,5	1,3-69,3	151,0-257,0
sabauda	8	38,6-86,4	3,4-14,4	5,2-56,8	142,5-304,5
botrytis	4	0,0-84,7	5,1-10,7	8,7-92,1	153,0-333,0
gemmifera	2	50,0-64,0	9,7-14,3	20,9-38,4	116,0-162,0
gongylodes	3	0,0-1,0	5,4-8,2	91,8-94,6	197,0-280,0
<u><i>B.campestris</i></u>					
pekinensis	16	64,9-92,0	4,4-26,3	2,9-13,4	55,1-230,0
chinensis	5	27,0-93,0	3,9-7,6	0,9-4,7	140,0-183,0
rapifera	3	0,0-92,0	6,8-12,1	0,4-89,6	165,0-261
oleifera	5	29,3-88,5	6,4-33,9	1,8-21,9	33,7-167,0

Der Gesamt- GSL- Gehalt der Samen der resyn- Linien wurde mit dem der Summe beider Eltern (p1 + p2) verglichen. Aus diesem Vergleich wird vermutet , dass der GSL - Gehalt der resyn - Linien im allgemeinen zwischen den Gehalten beider Eltern- formen liegt.

Tabelle 2. Glukosinolatgehalt (μmol GSL/gentfettetes Mehl von resyn- Linien und deren Eltern. (Mittelwerte von 2 Pflanzen je Erntejahr)

p1 = <i>B.oleracea</i>		R = resyn- Linien			p2 = <i>B.campestris</i>	
Sort. Nr.	GSL 1987	resyn- Linie	\bar{x} GSL (1986/87)	$\frac{R}{p1+p2}$	Sort.- Nr.	GSL 1987
2823	241,6	H240	181,1	0,52	43	103,5
2823	241,6	H250	208,1	0,58	2824	107,2
2823	241,6	H287	130,1	0,38	2366	101,6
2823	241,6	H357	161,0	0,44	2370	123,2

526	252,2	R73	175,0	0,61	2009	33,7
2118	181,0	G39	132,0	0,61	2009	33,7
2317	215,4	R59	177,3	0,71	2009	33,7
2330	211,2	G2	179,2	0,73	2009	33,7

521	198,0	H91	223,5	0,73	2824	107,2
581	197,0	H19	93,0	0,31	2824	107,2
587	152,6	H54	143,3	0,55	2814	107,2
2159	270,0	H89	120,4	0,31	2824	107,2

$$\bar{x} = 0,54$$

Bei den 12 in Tabelle (2) aufgeführten resyn- Linien wurde im Mittel nur 54% des Gesamt - GSL - Gehaltes beider Elternformen gefunden, d. h. durch Kombination der beiden Elterngenome jeweils nur die Hälfte ihres GSL - Gehaltes im Raps genom exprimiert wurde.

In Bezug auf das 4-Hydroxyglucobrassicin wurden die Gehalte der Ausgangseltern bei den resyn- Linien noch schwächer ausgebildet (Tab.3). Bei den aufgeführten resyn-Linien wurde im Mittel nur 29% des 4-OH - Gehaltes beider Ausgangseltern bestimmt. Nur bei Linie 'H19' erreichte der 4 - OH - Gehalt 45% der Summe beider Eltern (Tabelle 3).

Tabelle 3 . Der Gehalt an 4-Hydroxyglucobrassicin (4OH) ($\mu\text{mol/g}$ entfettetes Mehl) von 12 resyn-Linien und deren. Ausgangseltern. (Mittel - werte von 2 Pflanzen je Erntejahr).

p1 = B.oleracea		R = resyn-Linien			p2 = B.campestris	
Sort.- Nr.	(4OH) 1987	resyn- Linie	x (4OH) (1986/87)	$\frac{R}{p1+p2}$	Sort.- Nr.	(4OH) 1987
2823	15,5	H240	6,3	0,19	43	17,3
2823	15,5	H250	5,9	0,22	2824	10,9
2823	15,5	H287	7,4	0,29	2366	10,0
2823	15,5	H357	8,1	0,30	2370	11,9

2317	16,0	R59	8,4	0,31	2009	11,2
526	9,9	R73	4,0	0,19	2009	11,2
2330	8,8	G2	7,9	0,39	2009	11,2
2118	20,0	G39	9,5	0,30	2009	11,2

581	14,2	H19	11,3	0,45	2824	10,9
587	12,9	H54	8,8	0,37	2824	10,9
2150	12,9	H89	6,5	0,27	2824	10,9
521	12,3	H91	5,5	0,24	2824	10,9

$$\bar{x} = 0,29$$

DISKUSSION

Die Samen des natürlichen Rapses enthalten Progoitrin, Gluconapin und Glucobrassicinapin als Hauptglucosinolate. Einige andere wie 4-OHGBC, in geringen Mengen auf (MC Gregor 1978).

Früher wurden Versuche unternommen, durch Vergleich des GSL-Gehaltes der Ausgangseltern mit dem GSL-Gehalt der aus ihrer Kreuzung entstandenen resyn-Linien auf dessen Vererbung zu schliessen (Gland 1980, 1982). Mittels HPLC war es möglich, ausser Alkenyl-GSLe auch die Indol-, Schwefel und Aryl-GSLe besonders bei den Kohlformen, die zum Teil einen hohen Gehalt an diesen aufweisen - zu bestimmen. Bei den resyn-Linien führt eine starke Interaktion der beiden elterlichen Genome zu einer Uniformität des GSL - Musters.

Das GSL-Muster der resyn-Linien wird mehr durch das Genom des *B. campestris* Elter determiniert (Josefsson, 1972). GSLe, wie Glucoiberin und Glucoibervirin welche bei Kohlformen vorkommen, bei den resyn-Linien vollständig fehlen (Ahmadi 1988). Was aber den Gesamt - GSL - Gehalt - anbetrifft konnte von uns keine dominierende Rolle des *campestris* - Genoms festgestellt werden. Es liegen ausserdem Berichte vor, wonach die Vererbung des GSL-Gehaltes beim Raps zusätzlich durch das Plasmon beeinflusst wird (Lein 1972). Unsere Ergebnisse deuten auf eine intermediäre GSL-Vererbung bei "*B. oleracea* x *B. campestris*" Bastarde.

Die Hauptkomponente der Indol-GSLe beim Raps ist das 4-Hydroxyglucobrassicin. Der Gehalt an Indol GSLe wird in keiner Weise von den in manchen resyn-Linien gefundenen Reduktion der Alkenyl - GSLe beeinflusst. Der 4OH - Gehalt variierte bei untersuchten resyn - Formen von 3,0 - 16,6 μ mol (Ahmadi, 1988).

Im Vergleich zum Gesamt - GSL - Gehalt ist der Gehalt an 4-Hydroxyglucobrassicin der resyn - Linien noch niedriger und beträgt im Mittel etwa 30 % der Summe beider Eltern.

Summary

The selfed seeds of 39 *B. oleracea* and 30 *B. campestris* genotypes and rapeseed lines derived from their interspecific crosses, were analysed by HPLC for their GSL - Contents and - Patterns. The GSL - Content of the *B. oleracea* genotypes varied between 101/2 - 333,0 μ mol/g seeds. The *B. oleracea* genotypes showed a high content of progoitrin. The GSL-Content of synthetic rapeseed lines were compared with the sum of both parents (p1 + p2).

This comparison showed, That the GSL - Content of synthetic rapeseed lines was equal to half of both parents, quantity, so that an intermediate inheritance is presumable.

- Ahmadi, M. R. 1989. Charakterisierung der genetischen Variabilität von amphidiploiden resynthetischen Rapsformen und deren Ausgangseltern, Diss., FB. Agrarwiss., Universität Göttingen, 78pp.
- Buchner, R. 1988. Analyse und Biologie der Glucosinolate in Raps (*Brassica napus* L.). Diss., FB. Agrarwiss. Universität Göttingen, 111pp.
- Busch, H. und Röbbelen, G. 1981. Niedriger Glucosinolatgehalt als Zuchtziel für Winterraps. *Angew. Botanik* 55 : 361- 371.
- Downey, R.K., Craig, B.M. and Youngs, C.G. 1969. Breeding rapeseed for oil and meal. *J. Amer. Oil Chemists Soc.* 46 : 121 - 123 .
- Gland, A. 1980. Glucosinolatgehalt und -muster in den Samen resynthetisierten Rapsformen. Diss., FB. Agrarwiss. Universität Göttingen, 59pp.
- , 1982. Gehalt und Muster der Glucosinolate in Samen von resynthetisierten Rapsformen. *Z. Pflanzenzüchtg.* 88: 242 - 254.
- Josefsson, E. 1972. Variation of pattern and content of Glucosinolates in seeds of some cultivated Cruciferae. *Z. Pflanzenzüchtg.* 68 : 113-123 .
- KALASA - BALICKA, M. 1985. Characterization of synthetic *B.napus* L., *Genetica. Polonica*, 26 : 447 - 456.
- LEIN, K.- A. 1972. Genetische und Physiologische Untersuchungen zur Bildung von Glucosinolaten in Rapssamen. I. zur Vererbung der Glucosinolatarmut, *Z Pflanzenzüchtg.* 67 : 243- 246 .
- MC Gregor, D.I. 1978. Free Thiocyanate ion : A hydrolysis product of Glucosinolates from rape and mustard seed. *Can. J. plant. Sci.* 58 : 795-800
- SANG, J.P. and TRUSCOTT, R.J.W. 1984. Liquid chromatographic determination of glucosinolates in rapeseed as desulfo glucosinolates. *J. Assoc. of. Anal. Chem.* 67 : 829 - 833.
- THIES, W. 1988 : Isolation of sinigrin and glucotropaeolin from cruciferous seeds. *Fat Sci. Technol.* 90 : 311 - 314.
- . 1990. Photometric determination of indolylglucosinolates in seeds of rapeseed. *Fat Sci. Technol.* 92 : 161 - 164.