

DETERMINACION CUALITATIVA DEL CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS EN SEMILLAS DE RAPS (*Brassica napus* L.) A TRAVES DE GLUCOCINTA¹

Qualitative detection of glucosinolate in rapeseed (*Brassica napus* L.) through glucotape

Hugo Campos de Q.², Nilo Lizama A.² y María Graciela Márquez B.²

SUMMARY

In order to qualitatively assess the level of glucosinolates in rapeseed seeds, a modified method based on glucotape was used. By this method the glucosinolates are set in terms of glucose released through their enzymatic hydrolysis.

Data obtained showed that the method discriminates among rapeseed germplasm with differential amounts of glucosinolates ($R^2_{adj} = 0.60$; $\alpha = 0.01$). Furthermore, it can be used to cluster rapeseed germplasm with similar levels of glucosinolates.

Breeding and industrial applications are discussed, as well.

Key words: rapeseed, breeding, glucosinolates, glucotape, meal quality.

INTRODUCCION

En un restringido número de especies vegetales, pertenecientes al Orden Capparales, han sido identificados alrededor de 90 compuestos del tipo glucosinolatos. Un carácter compartido por los diversos glucosinolatos es la presencia de una molécula de glucosa dentro de su estructura química, además de átomos de azufre, carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno (Daun y McGregor, 1992).

Como otros metabolitos secundarios, los glucosinolatos *per se* carecen de efectos nocivos sobre los organismos que los ingieren. A pesar de lo anterior, algunos de los compuestos liberados en su hidrólisis enzimática poseen algunas propiedades que los convierten en compuestos tóxicos. Las especies que presentan glucosinolatos poseen, del mismo modo, la enzima mirosinasa (tioglucósido-glucosidrolasa; EC 3.2.3.1), la cual se encuentra separada espacialmente de los glucosinolatos debido a la compartimentalización de metabolitos existente en las plantas. Una vez producido algún tipo de daño mecánico o lesión a la semilla, la enzima actúa

sobre los glucosinolatos, hidrolizándolos. Los productos químicos de la hidrólisis enzimática son múltiples y dependientes de las condiciones en las cuales se consuma la reacción, sin embargo en forma genérica se identifican los siguientes compuestos: moléculas de glucosa y moléculas agluconas, entre las cuales destacan tiocianatos, isotiocianatos, oxazolidinetionas, nitrilos e iones bisulfato (Clossais-Bernard y Larher, 1991; Kuhlmann, Friedt y Marquard, 1991; Larsen, 1981; McGregor, Mullin y Fenwick, 1983).

Los efectos nocivos asociados al consumo de afrecho, con cantidades elevadas de glucosinolatos, se deben a los compuestos liberados como consecuencia de la hidrólisis enzimática, de los cuales los tio e isotiocianatos son los que exhiben una mayor potencialidad tóxica. Sin embargo, en especies crucíferas de tipo hortícola, tales como rábano, mostaza, repollo, coliflor y bruselas, entre otras, los glucosinolatos juegan un rol fundamental en su aceptación organoléptica, por parte de los consumidores, puesto que los compuestos producidos en su hidrólisis enzimática otorgan tanto el aroma distintivo como el sabor amargo característico de tales hortalizas (Daxenbichler, VanEtten y Williams, 1979; Ribbelen y Thies, 1980).

Uno de los objetivos principales de todo programa de mejoramiento genético es el desarrollo de

¹Recepción de originales: 28 de marzo de 1994.

La presente investigación forma parte del proyecto "Investigación para la obtención de variedades de raps de tipo doble cero", financiado por el Fondo de Investigaciones Agropecuarias (FIA).

²Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

materiales que presenten una elevada calidad. En el caso particular del raps, uno de los parámetros que define su calidad, es el contenido de glucosinolatos, el cual no debe sobrepasar los 30 μ moles de glucosinolatos por gramo de afrecho desgrasado. Mediante la utilización de variedades de raps que presenten un nivel reducido de glucosinolatos, denominadas variedades de tipo doble cero o canolas, sería factible incrementar el consumo de afrecho de raps en nutrición animal.

La metodología ideal de análisis instrumental de los glucosinolatos a utilizar en un programa de mejoramiento genético de raps debe reunir las siguientes propiedades: precisa, presentar una elevada reproducibilidad, relativamente rápida, simple y, además, de un costo razonablemente bajo. Los métodos desarrollados hasta el momento pueden dividirse, someramente, en dos grupos: uno que utiliza métodos con instrumental moderno, otorgando resultados precisos, reproducibles, altamente confiables y de elevado costo. El otro grupo lo conforman otros métodos que sacrifican algún grado de precisión y exactitud, en aras de un costo inferior y una mayor simplicidad de acción. Las metodologías mencionadas en el último grupo se refieren a las denominadas "de barrido" ("screening methods") (Daun y McGregor, 1992).

Una de las metodologías incluidas en este último conjunto son aquellas basadas en el uso de glucocintas desarrolladas para evaluar los niveles de glucosa existente en la orina humana. Tales métodos permiten realizar a un bajo costo la determinación cualitativa de los glucosinolatos en un gran número de muestras a través de la determinación cualitativa de la glucosa liberada por la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos existentes en la semilla de raps (Lein, 1970; Rayner, Sang y Buzza, 1975). En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos con la implementación de dicha técnica en nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

En la presente investigación se utilizó la glucocinta marca "Ely Lilly", la cual está impregnada de las enzimas glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y peroxidasa (EC 11.1.1.7), o-toluidina, así como del colorante FDC Yellow N° 5, el cual adquiere tonalidades verdes de distinta intensidad en función de la glucosa existente en una muestra.

La metodología utilizada está basada en el método de McGregor y Downey (1975), con algunas modificaciones tendientes a simplificar su utilización:

Se tomaron cinco semillas de raps, las cuales se inmovilizaron mediante una cinta adhesiva. A continuación, se maceraron con un vástago de mortero, para posteriormente agregárseles 100 μ l de agua destilada. Subsecuentemente, se depositó durante tres minutos un trozo de 1 cm de glucocinta sobre el homogeneizado. Una vez transcurrido dicho plazo, el color desarrollado se comparó con los patrones de colores incluidos en el envase de la glucocinta. El color desarrollado se evaluó con un decimal en una escala 0-5 (Cuadro 1). A lo largo del presente trabajo, el nivel de glucosinolatos, determinado en forma cualitativa mediante glucocinta, se referirá como "nota de glucosinolatos", o "nota".

CUADRO 1. Notas asignadas a los niveles de glucosa determinados

TABLE 1. Notes assigned to the determined glucose levels

Nota	Contenido de glucosa, %
0 - 1	0,0
1 - 2	0,1
2 - 3	0,25
3 - 4	0,5
4 - 5	> 2,0

A objeto de determinar la interferencia de la glucosa endógena presente en las semillas sobre los valores encontrados, se tomaron dos muestras, una de una variedad de raps con un elevado tenor de glucosinolatos (variedad Matador), y otra de la variedad Global, la cual presenta un bajo nivel de glucosinolatos. Las muestras señaladas se identificaron como Matador 1 y Global 1, respectivamente, y se sometieron a la evaluación descrita una vez que se inactivó la enzima mirosinasa presente en dichas semillas, lo cual se logró mediante su exposición a 110 °C durante 12 horas.

El diseño estadístico utilizado consistió de un arreglo en bloques completos al azar, utilizándose veinte materiales genéticos de raps (líneas avanzadas y variedades introducidas) y ocho repeticiones.

La información así generada se sometió a un análisis de la variancia, separándose las medias de los tratamientos mediante la Prueba de Duncan ($\alpha = 0,01$). Además, se realizó un análisis de regresión simple sobre los niveles reales de glucosinolatos existentes en las líneas avanzadas evaluadas, los cuales se determinaron mediante cromatografía gas-líquido en los laboratorios de la empresa Plant Genetic Systems (Saskatoon, Canadá).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de conglomerados sobre las notas tomadas, a objeto de verificar si la información obtenida a través de la presente metodología permite agrupar variedades de raps que contengan un nivel homogéneo de glucosinolatos.

Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el programa SAS versión 6.04 (SAS, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSION

La técnica utilizada demostró ser de utilidad en la discriminación de materiales genéticos con un distinto nivel de glucosinolatos. El análisis de variancia determinó la existencia de diferencias significativas entre las notas tomadas a las distintas líneas avanzadas y variedades introducidas, lo que indica que ellas poseen niveles diferenciales de glucosinolatos. El valor F obtenido (23,34) fue altamente significativo.

Se observa que las variedades evaluadas Global, Sv 0218, Sintético y Silvia presentaron los menores valores en la nota asignada, lo que se explica en base a sus reducidos niveles de glucosinolatos, mientras que las restantes líneas experimentales presentaron valores superiores, directamente relacionados con sus elevados niveles de glucosinolatos (Cuadro 2).

Es importante destacar las notas obtenidas por aquellas muestras que presentan la enzima mirosinasa inactivada (0,75 y 0,70 para Matador 1 y Global 1, respectivamente), puesto que indican que los niveles de glucosa endógena existente en el germoplasma evaluado, la cual no procede de la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos, son reducidos y no interfieren con la determinación cualitativa de los glucosinolatos presentes en tales muestras, concordando con lo señalado por Smith, Parsons y Starr (1985). Lo anterior es de suma importancia puesto que, de producirse la situación contraria, es decir la presencia de un nivel elevado de glucosa endógena, el uso de glucocintas conduciría a la clasificación de materiales con un nivel real reducido de glucosinolatos como materiales con niveles elevados de glucosinolatos, lo cual evidentemente repercutirá negativamente sobre la eficiencia de selección lograda en el mejoramiento genético del raps.

La información obtenida concuerda con McGregor y Downey (1975), quienes utilizando una técnica similar a la descrita ordenaron variedades de raps con niveles diferenciales de glucosinolatos de un modo muy similar al ordenamiento basado en valores obtenidos mediante cromatografía. Asimismo,

CUADRO 2. Notas obtenidas por las líneas experimentales y variedades evaluadas y contenido real de glucosinolatos

TABLE 2. Notes obtained from the breeding lines and varieties evaluated and actual glucosinolate content

Material genético	Nota asignada	Contenido real glucosinolatos ($\mu\text{mol/g}$)
Norin 16	3,27 a	72,0
RC. 10019-91	3,27 a	131,0
RC. 10008-91	3,02 ab	125,8
RC. 10018-91	2,87 ab	112,5
RC. 10005-91	2,82 b	89,5
RC. 10009-91	2,71 bc	122,0
RC. 10006-91	2,42 cd	97,0
RC. 10011-91	2,37 def	94,0
Matador	2,28 efg	120,8
RC. 10019-91	1,97 fg	131,0
RC. 10010-91	1,88 fg	86,0
RC. 10007-91	1,86 gh	73,0
RC. 10012-91	1,77 gh	67,0
RC. 10017-91	1,65 h	59,0
Mikado	1,62 h	46,0
Ñielol	1,32 i	44,0
Global	1,24 jk	19,0
Sv 0218	1,00 jk	29,5
Silvia	0,93 jk	25,0
Sintético	0,74 jk	29,5
Matador ¹	0,75 jk	120,8
Global ¹	0,70 jk	19,0

¹Muestras con la mirosinasa inactivada.

Letras distintas indican diferencias significativas según la Prueba de Duncan ($\alpha = 0,01$).

concuera con lo señalado por Rayner, Sang y Buzza (1975), quienes indican que las metodologías basadas en glucocintas permiten eliminar una gran cantidad de material segregante que exhiba un nivel elevado de glucosinolatos.

Rubenschuh, Marquard y Friedt (1991) concluyeron que la utilización de glucocintas conduce a una elevada proporción de muestras mal clasificadas, sin embargo, en dicha investigación, la totalidad de las muestras utilizadas poseen bajo 30 $\mu\text{moles/gramo}$ de afrecho, rango en el cual es sumamente difícil apreciar visualmente los sutiles cambios de tonalidad causados por los reducidos niveles de glucosa liberada mediante la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos.

El coeficiente de correlación lineal existente entre las notas tomadas y los niveles reales de glucosinolatos existentes en los materiales evaluados, excluyendo las muestras Global 1 y Matador 1, fue de 0,72 y altamente significativo, el cual si bien es inferior al informado por McGregor y Downey (1975), se enmarca dentro de los niveles de preci-

si3n obtenidos en aquellas pruebas de selecci3n utilizadas por diversos programas de mejoramiento gen3tico.

En cuanto al an3lisis de regresi3n efectuado (Figura 1), este indica la existencia de una funci3n lineal entre el contenido real de glucosinolatos y la nota determinada. La presencia de dicha funci3n lineal es de suma importancia en la utilizaci3n de la glucocinta, puesto que al ser una prueba basada en la apreciaci3n visual de diversas tonalidades, la presencia de relaciones no lineales evidentemente dificultar3a la evaluaci3n visual de materiales que presenten niveles diferenciales de glucosinolatos. El coeficiente de regresi3n ajustado obtenido fue de 0,60 y altamente significativo.

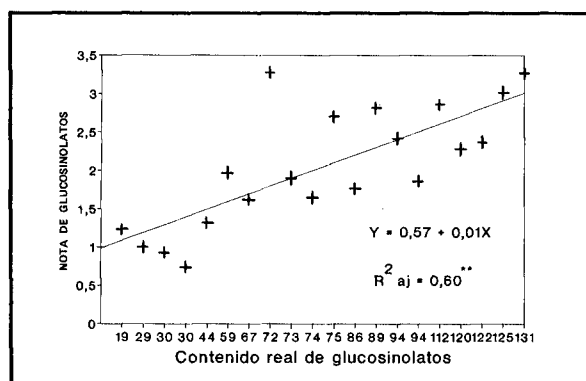


FIGURA 1. Relaci3n entre las notas tomadas y el contenido real de glucosinolatos (micromoles/ gramo afrecho).

FIGURE 1. Relationship between assigned notes and the actual glucosinolates amount (micromoles/ meal gram).

Excluyendo a Global 1 y Matador 1, es posible organizar los valores obtenidos con la glucocinta en 3 grupos distintos, los cuales corresponden a un nivel bajo, medio y elevado de glucosinolatos (Figura 2). La agrupaci3n en tres conglomerados result3 ser la m3s consistente con el comportamiento general de las variedades en relaci3n al contenido real de glucosinolatos y las notas tomadas a las diversas muestras. Desde el punto de vista del mejorador de raps, el conglomerado m3s importante es aqu3l que engloba a las cuatro variedades que poseen un nivel bajo de glucosinolatos (Global, Silvia, Sint3tico y Sv 0218), puesto que dicho conglomerado permite agrupar aquellas l3neas experimentales que posean un nivel cualitativo reducido de glucosinolatos. Adem3s, la agrupaci3n en con-

glomerados permite la utilizaci3n de la presente t3cnica en la evaluaci3n de recursos gen3ticos de raps, situaci3n en la cual es de mayor importancia el agrupar materiales que compartan una cualidad dada que el determinar con precisi3n el nivel exacto de glucosinolatos existente.

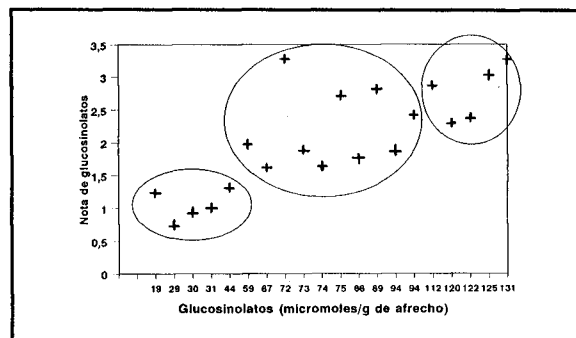


FIGURA 2. Conglomerados obtenidos en un plano, definidos seg3n primer y segundo componentes principales.

FIGURE 2. Clusters distributed on a plane defined by the first and second principal component axes.

Las notas tomadas presentaron consistencia a trav3s de los an3lisis estad3sticos efectuados. Sin embargo, la variedad Nor3n 16, la cual posee un nivel medio a alto de glucosinolatos, present3 una elevada nota.

CONCLUSIONES

- La metodolog3a evaluada permite identificar aquellos materiales que presentan un nivel reducido de glucosinolatos con una certeza apropiada para un m3todo de selecci3n.
- Los niveles de glucosa end3gena determinados no interfieren con la determinaci3n cualitativa de glucosinolatos en la semilla de raps.
- Es factible la agrupaci3n de los distintos materiales evaluados en base a un nivel bajo, medio o alto de glucosinolatos.
- La prueba de la glucocinta permite discriminar entre materiales con un nivel diferencial de glucosinolatos, pudi3ndose utilizar tanto por los programas de mejoramiento gen3tico de raps como por otros agentes participantes en el mercado del raps, como son las compa3n3as productoras de aceite o las empresas productoras de semillas.

RESUMEN

A objeto de determinar en forma cualitativa el nivel de glucosinolatos en semillas de raps, se utilizó una técnica modificada basada en glucocintas, la cual determina el nivel de glucosinolatos en función de la glucosa liberada en la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos.

La información obtenida indica que el método utilizado permite discriminar entre materiales de raps con niveles diferenciales de glucosinolatos ($R^2_{aj} = 0,60$; $\alpha = 0,01$). Del mismo modo, permite agrupar

materiales de raps que presenten contenidos similares de glucosinolatos.

Se discuten las aplicaciones prácticas de la metodología, la que puede utilizarse tanto en programas de mejoramiento genético como por otros agentes del mercado del raps.

Palabras claves: raps, mejoramiento, glucosinolatos, glucocinta, calidad de afrecho.

LITERATURA CITADA

- CLOSSAIS-BERNARD, N. and LARHER, F. 1991. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *J. Sci. Food Agric.* 56: 25-38.
- DAUN, J. and MCGREGOR, I. 1992. Glucosinolates in seeds and residues. In: J. Rossell y J. Pritchard (ed.). *Analysis of oilseeds, fats and fatty foods*, Elsevier Science Publishers, London. p.: 85-227.
- DAXENBICHLER, M.; VANETTEN, C. and WILLIAMS, P. 1979. Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Analysis of 14 varieties of chinese cabbage. *J. Agric. Food Chem.* 27(1): 34-37.
- KUHLMANN, H.; FRIEDT, W. y MARQUARD, R. 1991. Effects of siliquposition on seed glucosinolate content studied in doubled haploid rapeseed. In: *Proceedings Eighth International Rapeseed Congress*, Saskatoon, Canadá. p.: 1.541-1.544.
- LARSEN, P. 1981. Glucosinolates. In: Stumpf, P. y Conn, E. (ed.). *The biochemistry of plants*. Academic Press. Vol. 7. p.: 501-523.
- LEIN, K. 1970. Methods for quantitative determination of seed glucosinolates of *Brassica* species and their application in plant breeding of rape low in glucosinolate content. *Z. Pflanzenzucht.* 63:137-154.
- MCGREGOR, I. and DOWNEY, K. 1975. A rapid and simple assay for identifying low glucosinolate rapeseed. *Can. J. Plant Sci.* 55: 191-196.
- MCGREGOR, I.; MULLIN, W. and FENWICK, G. 1983. Review of analysis of glucosinolates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(4): 825-849.
- RAYNER, C.; SANG, J. and BUZZA, C. 1975. Screening rapeseed (*B. napus*) for low glucosinolate levels. *Aust. J. Exp. Agr. An. H.* 15: 561-565.
- RÖBBELEN, G. and THIES, W. 1980. Variation in rapeseed glucosinolates and breeding for improved meal quality. In: Tsunoda, S.; Hinata, K. y Gómez-Campo, C. (ed.). *Brassica crops and wild allies*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo. p.: 285-298.
- RUBENSCHUH, U.; MARQUARD, R. and FRIEDT, W. 1991. Methodical investigations on glucosinolate determination of oilseed rape. In: *Proceedings Eighth International Rapeseed Congress*, Saskatoon, Canadá. p.: 1.325-1.330.
- SAS INSTITUTE INC. 1993. *Sas/Stat User's Guide*, Release 6.04 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SMITH, D.; PARSONS, D. and STARR, C. 1985. A simple and rapid method of quantitatively measuring the glucosinolate concentration of rapeseed. *J. Agric. Sci. (Camb)*. 105: 597-603.