

Andrzej Wojciechowski, Agnieszka Przybył, Janetta Niemann, Błażej Springer
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Zastosowanie metody prześwietlania zalążków do szacowania efektywności zapylenia przy oddalonych krzyżowaniach w rodzaju *Brassica*

Cleared-ovule method applied to the evaluation of the effectiveness of pollinations in wide crosses within *Brassica* genera

Słowa kluczowe: *Brassica*, krzyżowanie oddalone, rozwój zarodka, technika prześwietlania zalążków, promieniowanie UV

W pracy podjęto próbę adaptacji metody prześwietlania zalążków, opracowanej w 2004 roku przez Ponitkę i Ślusarkiewicz-Jarzinę (2004) dla zbóż w celu oceny skuteczności zapyleń międzygatunkowych w rodzaju *Brassica*. Materiał badawczy stanowiły 10- i 15-dniowe łuszczyzny powstałe w wyniku zapylenia rzepaku ozimego i jarego (*B. napus*) oraz gorczycy etiopskiej (*B. carinata*) i żółtonasiennego rzepiku jarego (*B. campestris* ssp. *trilocularis*, cv. Yellow Sarson) pyłkiem różnych gatunków *Brassica* napromieniowanym promieniami UV-C.

Uzyskane dane wskazują, że metoda prześwietlania zalążków opracowana przez Ponitkę i Ślusarkiewicz-Jarzinę, po małych modyfikacjach może być z powodzeniem stosowana dla obserwacji rozwoju zarodka u gatunków z rodzaju *Brassica*, bez konieczności stosowania czasochłonnej i kosztownej metody parafinowej.

Efektywność wykonanych krzyżowań międzygatunkowych była znacząco niższa w porównaniu z krzyżowaniami wewnątrzgatunkowymi. Ponadto, w zwrotnych krzyżowaniach międzygatunkowych obserwowano różną efektywność w zależności od tego, która z form stanowiła formę mateczną.

Key words: *Brassica*, interspecific crosses, embryo formation, cleared-ovule technique, UV-radiation

An attempt was made to adapt a cleared-ovule method developed by Ponitka and Ślusarkiewicz-Jarzinę (2004) for evaluation of crossing effectiveness in wide crosses within *Brassica* genera. The material used in this experiment consisted of 10 and 15 day old siliqua obtained after pollination of winter and spring oilseed rape (*B. napus*), Ethiopian mustard (*B. carinata*) and yellow seeded spring turnip rape (*B. campestris* ssp. *trilocularis*, cv. Yellow Sarson) with pollen of different *Brassica* species treated by different doses of UV radiation.

Obtained data showed that cleared-ovule method elaborated previously for cereal crops can be successfully applied for the observation of *Brassica* embryo development after some small modification, instead of applying a time-consuming paraffin method.

Effectiveness of interspecific crosses was considerably lower as compared to intraspecific crosses. Moreover in reciprocal interspecific crosses different effectiveness was observed depending on the maternal form.

Wstęp

Emitowane przez słońce promieniowanie ultrafioletowe jest zróżnicowane pod względem długości fali: UV-C (200–280 nm), UV-B (280–320 nm) oraz UV-A (320–380 nm). Warstwa ozonowa zatrzymuje całkowicie promieniowanie UV-C, a pozostałe dwa rodzaje są przepuszczane i docierają do powierzchni Ziemi. W wyniku działalności człowieka zanika ozon w stratosferze, co powoduje wzrost przenikalności fal z zakresu 280–320 nm. Natomiast pochłanianie promieniowania UV-A nie jest powiązane z grubością warstwy ozonowej.

Promieniowanie ultrafioletowe oddziałuje na każdy żywy organizm. Na podstawie badań stwierdzono, że w przypadku wielu gatunków roślin może być nawet głównym czynnikiem regulującym ich rozwój i wzrost (Jordan 1996). Jednocześnie rodzaj i zakres konsekwencji napromieniowania są bardzo zmienne i zależą od wrażliwości danego gatunku, intensywności naturalnego ultrafioletu, warunków środowiska oraz równoczesnego oddziaływania innych czynników biotycznych i abiotycznych. Na sam stopień wrażliwości danej rośliny wpływa jej genotyp, ekotyp oraz stadium ontogenezy, w jakim się znajduje (Kravets i in. 2008). W celu zminimalizowania ewentualnych szkód, rośliny wykształciły wiele mechanizmów obronnych. Należą do nich np. zwiększanie grubości warstwy wosku na liściach czy produkcja wtórnych metabolitów, takich jak fenole i flawonoidy, a następnie gromadzenie ich w warstwie naskórka (Kakani i in. 2003). Wszystkie zależności pomiędzy roślinami a promieniowaniem UV nie zostały jeszcze dokładnie poznane i pozostają nadal obiektem intensywnych analiz doświadczalnych.

Podjęte w pracy badania mają również na celu dostarczenie dodatkowych informacji, które mogłyby przyczynić się do wyjaśnienia specyfiki oddziaływania promieniowania UV na organizm roślinny, a w tym konkretnym przypadku na ziarna pyłku. Osłabione pod wpływem UV ziarna pyłku po ich użyciu do zapylania mogłyby stymulować rozwój komórki jajowej w zarodek bez udziału zapłodnienia.

Krzyżowanie oddalone, polegające na krzyżowaniu ze sobą osobników należących do dwóch różnych gatunków lub rodzajów, napotyka na swojej drodze wiele przeszkód. Zaobserwowane trudności w przypadku roślin to m.in. słabe kiełkowanie pyłku, zbyt długa w stosunku do łagiewki pyłkowej szyjka słupka, zaburzenia występujące podczas mejozy czy obumieranie zarodków (skutek wczesnego zamierania endospermu). Jeśli uda się uzyskać nasiona, to rozwinięte z nich rośliny wykazują często obniżoną płodność lub są całkowicie sterylne. Wykorzystanie takich roślin jest możliwe po przywróceniu im zdolności do wytwarzania nasion. Pomimo wielu problemów krzyżowanie oddalone jest często wykorzystywane w hodowli, ponieważ pozwala przenieść niektóre cenne cechy, jak np. odporność na choroby czy suszę, z jednego gatunku do drugiego.

Eksperyment, którego efektem jest niniejsza praca, dotyczył oceny wpływu promieniowania UV na niektóre gatunki rodzaju *Brassica*, uwzględniając aspekt

krzyżowania oddalonego. Na celu miał przede wszystkim ocenę możliwości użycia metody prześwietlania zalążków do szacowania efektywności wykonanych krzyżowań oddalonych.

Material i metody

Material roślinny użyty w eksperymencie przedstawiono w tabeli 1, która zawiera również informację odnośnie wykonanych kombinacji krzyżowań. Nasiona pochodziły z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Tabela 1

Zestawienie gatunków *Brassica* wykorzystanych do kombinacji krzyżowań
List of Brassica species used in cross combinations

Kombinacja zapylania — <i>Combination of pollination</i>	
♀	♂
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. Topas	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. White Flower <i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson <i>B. carinata</i>
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. White Flower	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. Topas <i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson <i>B. carinata</i>
<i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson <i>B. carinata</i>	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. White Flower <i>B. carinata</i> <i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> cv. White Flower <i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>biennis</i> , męskosterylna linia MS-8 <i>male sterile line MS-8</i>	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>biennis</i> cv. Lisek <i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i> cv. Herkules

Pyłek do zapylania słupek pobierano z kwiatów naświetlanych promieniami UV (Philips TUV 30W/G30 T8 Long Life — dł. fali 253,7 nm) w dawkach będących kombinacją odległości od źródła promieniowania (10, 30 i 50 cm) oraz czasu traktowania (20, 40 lub 60 minut). Zapylenie przeprowadzano bezpośrednio po naświetleniu. Różne czasy i odległości tworzyły kombinację odniesienia dla badania wpływu promieniowania UV na rozwój zarodków. Dla większej przejrzystości czasowo-odległościowej, kombinacje traktowania pyłku promieniami UV przyjęto określać symbolami od 1 do 10. Wyjaśnienie tych symboli przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Oznaczenia sposobu traktowania pyłku promieniami UV-C przyjęte w doświadczeniu
Symbols accepted for the way of treating pollen with UV-C rays in the experiment

Sposób traktowania pyłku promieniami UV-C — <i>Way of treating pollen to UV-C rays</i>													
Kombinacja	Czas traktowania <i>Time of treating</i> [min.]			Odległość od źródła promieniowania <i>Distance from the</i> <i>source radiation</i> [cm]			Kombinacja	Czas traktowania <i>Time of treating</i> [min.]			Odległość od źródła promieniowania <i>Distance from the</i> <i>source radiation</i> [cm]		
	20	40	60	10	30	50		20	40	60	10	30	50
1	+			+			6		+				+
2	+				+		7			+	+		
3	+					+	8			+		+	
4		+		+			9			+			+
5		+			+		K	Pyłek kontrolny — <i>Test pollen</i>					

Efektywność zapylenia szacowano na podstawie liczby zalążków rozwiniętych w łuszczyńce i zawierających zarodki. W tym celu po upływie 10 i 15 dni od zapylenia z poszczególnych kombinacji zapylenia utrwalano po dwie łuszczyzny (utrwalacz — mieszanina 40% formaliny, 40% chloroformu i 70% etanolu (EtOH) w stosunku 5 : 5 : 90).

Rozwój zalążków i obecność w nich zarodków mieszańcowych analizowano przy zastosowaniu metody prześwietleniowej (Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina 2004) w modyfikacji własnej. Wykształcone łuszczyzny utrwalano, a następnie odwadniano, umieszczając je na 2 godziny w rosnącym szeregu alkoholowym: 70, 80, 90 i 99,8% EtOH. Odwodnione zalążki umieszczano w mieszaninach salicylanu metylowego i 99,8% EtOH, sukcesywnie po 2 godzinach w roztworach 1 : 1, 3 : 1 i ostatecznie w czystym salicylanie 2 razy po 1 godzinie.

Z każdej kombinacji po zapyleniu analizowano po 2 łuszczyzny. Obserwacje zalążków i zarodków prowadzono przy użyciu kontrastu fazowego w mikroskopie Nikon. Kontrolę stanowiły łuszczyzny powstałe w wyniku obcozapylenia form matecznych pyłkiem nie traktowanym promieniowaniem UV-C.

Wyniki

Efektywność poszczególnych krzyżowań wyrażona procentowym stosunkiem liczby zalążków zawierających zarodki w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku była różna i wyniki przedstawiono w tabelach 3–7. W tabelach podano również przeżywalność zalążków w zależności od czasu, który upłynął od zapylenia.

Tabela 3
 Efektywność krzyżowania wewnątrzgatunkowego rzepaku jarego (*B. napus*) odmiana White Flower z odmianą Topas oraz międzygatunkowego z *B. campestris* (rzepik jary) i *B. carinata* (gorczyca etiopska) — *Effectiveness of intraspecific crosses of spring rape (B. napus) White Flower variety with the Topas variety and interspecific crosses with B. campestris and B. carinata*

Forma ojcowska <i>Paternal form</i> ♂	Kombinacja	Procent żywych zalążków po określonej liczbie dni od zapylenia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Per cent of living ovules after the determined number of days after pollination with reference to the average number of ovules in the pistil*</i>		Procent zalążków żywych zawierających zarodki po określonej liczbie dni od zapylenia <i>Per cent of living ovules containing embryos after the determined number of days after pollination</i>		Efektywność zapłodnienia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Effectiveness of fertilizing ovules with reference to the average number of ovules in the pistil</i> [%]
		10 dni – days	15 dni – days	10 dni – days	15 dni – days	
<i>B. napus</i> cv. Topas	1	87,2	78,0	63,2	91,2	63,1
	2	82,6	80,3	47,2	97,1	58,5
	3	91,7	87,2	82,5	89,5	76,8
	4	84,9	84,9	75,7	91,9	71,1
	5	84,9	59,6	45,9	84,6	44,7
	6	87,2	82,6	97,4	58,3	66,5
	7	91,7	87,2	85,0	73,7	71,1
	8	87,2	82,6	100,0	55,6	66,5
	9	87,2	84,9	94,7	100,0	83,7
	K	91,7	73,4	70,0	96,9	67,7
<i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson	1	43,6	39,0	68,4	76,5	29,8
	2	45,9	41,3	90,0	61,1	33,3
	3	41,3	39,0	77,8	88,2	33,3
	4	48,2	34,4	100,0	93,3	40,1
	5	43,6	39,0	100,0	94,1	40,1
	6	29,8	20,6	84,6	55,6	18,3
	7	36,7	27,5	68,8	75,0	22,9
	8	36,7	29,8	75,0	69,2	24,1
	9	52,8	48,2	78,3	90,5	42,4
	K	55,0	45,9	87,5	100,0	47,0
<i>B. carinata</i>	1	82,6	71,1	55,6	100,0	58,5
	2	41,3	68,8	61,1	66,7	35,6
	3	32,1	59,6	42,9	61,5	25,2
	4	36,7	32,1	50,0	100,0	25,2
	5	80,3	89,4	82,9	89,7	73,4
	6	29,8	13,8	92,3	100,0	20,6
	7	66,5	82,6	86,2	86,1	64,2
	8	43,6	32,1	89,5	78,6	32,1
	9	45,9	34,4	90,0	73,3	33,3
	K	64,2	87,2	57,1	94,7	59,6

* — średnia liczba zalążków w słupku u odmiany White Flower = 21,8
the mean number of ovules in the pistil of the variety White Flower = 21.8

Tabela 4

Efektywność krzyżowania wewnątrzgatunkowego rzepaku jarego (*B. napus*) odmiana Topas z odmianą White Flower oraz krzyżowania międzygatunkowego z *B. campestris* i *B. carinata* — *Effectiveness of intraspecific crosses of spring rape (B. napus) Topas variety with the White Flower variety and interspecific crosses with B. campestris and B. carinata*

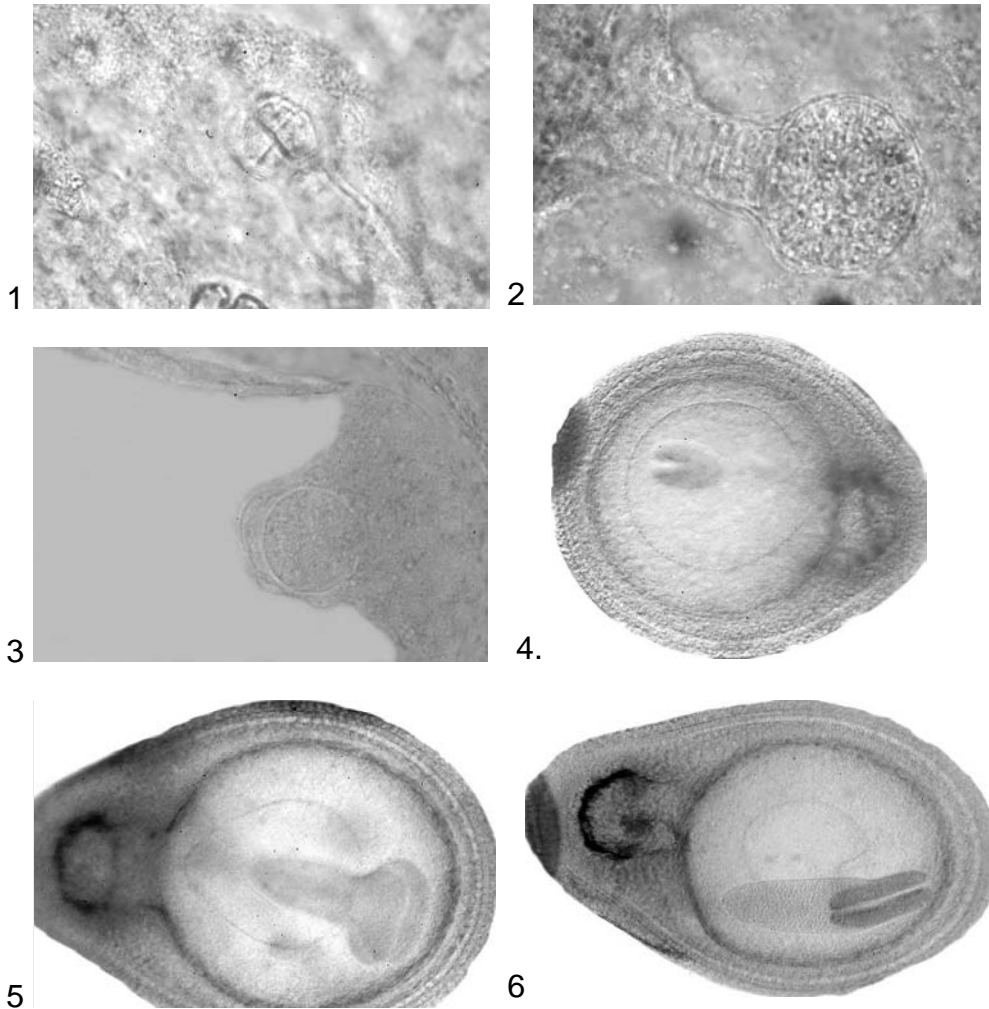
Forma ojcowska <i>Paternal form</i> ♂	Kombinacja	Procent żywych zalążków po określonej liczbie dni od zapylenia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku*		Procent zalążków żywych zawierających zarodki po określonej liczbie dni od zapylenia		Efektywność zapłodnienia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Effectiveness of fertilizing ovules with reference to the average number of ovules in the pistil</i> [%]
		<i>Per cent of living ovules after the determined number of days after pollination with reference to the average number of ovules in the pistil*</i>		<i>Per cent of living ovules containing embryos after the determined number of days after pollination</i>		
		10 dni – <i>days</i>	15 dni – <i>days</i>	10 dni – <i>days</i>	15 dni – <i>days</i>	
<i>B. napus</i> cv. White Flower	1	95,8	88,8	70,7	71,1	65,4
	2	84,1	79,4	75,0	67,6	58,4
	3	95,8	86,4	63,4	75,7	63,1
	4	86,4	79,4	62,2	55,9	49,1
	5	86,4	77,1	91,9	63,6	64,3
	6	93,5	84,1	90,0	83,3	77,1
	7	81,8	60,7	54,3	76,9	45,6
	8	86,4	77,1	51,4	72,7	50,2
	9	65,4	95,8	64,3	92,7	65,4
	K	81,8	74,8	77,1	96,9	67,8
<i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson	1	35,0	30,4	86,7	46,2	22,2
	2	39,7	32,7	82,4	0,0	16,4
	3	35,0	21,0	46,7	0,0	8,2
	4	32,7	32,7	71,4	71,4	23,4
	5	28,0	9,3	58,3	100,0	12,9
	6	49,1	35,0	100,0	20,0	28,0
	7	35,0	44,4	73,3	5,3	14,0
	8	44,4	42,1	63,2	0,0	14,0
	9	42,1	37,4	100,0	6,3	22,2
	K	53,7	42,1	52,2	100,0	35,0
<i>B. carinata</i>	1	58,4	25,7	88,0	0,0	25,7
	2	37,4	7,0	93,8	33,3	18,7
	3	44,4	44,4	100,0	78,9	39,7
	4	28,0	18,7	100,0	100,0	23,4
	5	46,7	37,4	80,0	6,3	19,9
	6	44,4	42,1	94,7	0,0	21,0
	7	32,7	4,7	92,9	50,0	16,4
	8	44,4	37,4	100,0	0,0	22,2
	9	42,1	30,4	100,0	0,0	21,0
	K	51,4	49,1	72,7	52,4	31,5

* — średnia liczba zalążków w słupku u odmiany Topas = 21,4
the mean number of ovules in the pistil of the variety Topas = 21.4

W przypadku, gdy formę mateczną stanowiły odmiany rzepaku jarego (*B. napus*) White Flower i Topas efektywność zwrotnych krzyżowań tych dwóch odmian po zapyleniu pyłkiem kontrolnym wyniosła odpowiednio 67,7 i 67,8% (tab. 3 i 4). Zapylenie odmiany White Flower pyłkiem odmiany Topas traktowanym różnymi dawkami promieniowania UV-C skutkowało różną efektywnością przy zastosowanych dawkach traktowania, która wyniosła od 44,7% (5 kombinacja traktowania — tab. 3) do 83,7% (9 kombinacja traktowania). Znacząco niższą efektywność obserwowano w krzyżowaniach międzygatunkowych dwóch odmian rzepaku jarego z żółtonasiennym rzepikiem Yellow Sarson (*B. campestris*) i gorczycą etiopską (*B. carinata*) (tab. 3 i 4). Wyższą efektywność krzyżowań obserwowano w przypadkach, gdzie formę mateczną stanowiła odmiana White Flower, u której po zapyleniu kontrolnym pyłkiem Yellow Sarson 47% zalążków zawierało zarodki, a po zapyleniu pyłkiem *B. carinata* – 59,6% (tab. 3). W tych krzyżowaniach, w których formę mateczną stanowiła odmiana Topas efektywność wyniosła odpowiednio 35 i 31,5% (tab. 4). Po zapyleniu dwóch odmian rzepaku jarego pyłkiem Yellow Sarson i *B. carinata* traktowanym promieniowaniem UV-C efektywność krzyżowań była w większości kombinacji niższa w porównaniu z zapyleniem pyłkiem kontrolnym. Była ona wyższa w dwóch kombinacjach zapylenia odmiany White Flower pyłkiem *B. carinata* traktowanym UV-C i wyniosła odpowiednio 73,4 i 64,2% (tab. 3 — 5 i 7 kombinacja) oraz w jednej kombinacji zapylenia odmiany Topas pyłkiem *B. carinata*, gdzie w kombinacji 3 odnotowano 39,7% efektywności, a w kombinacji kontrolnej 31,5% (tab. 4). Ponadto, w krzyżowaniach międzygatunkowych po 15 dniach od zapylenia obserwowano szersze spektrum stadiów rozwojowych zarodka, począwszy od wczesno-globularnego do późnej torpedy (fot. 1–6), podczas gdy w krzyżowaniach wewnątrzgatunkowych obserwowano jedynie prawie dojrzałe zarodki (fot. 7).

W krzyżowaniach oddalonych, w których rzepak jary stanowił formę zapyłającą obserwowano wyraźnie niższą efektywność w porównaniu z kombinacjami, w których stanowił on formę mateczną. Jednak generalnie wyższa efektywność wystąpiła w krzyżowaniach, w których formę mateczną stanowił rzepik Yellow Sarson, gdzie 16,3% zalążków zawierało zarodki (tab. 5) po zapyleniu nienaświetlanym pyłkiem odmiany White Flower. W krzyżowaniu *B. carinata* × White Flower zaledwie 1,2% zalążków zawierało zarodki (tab. 6).

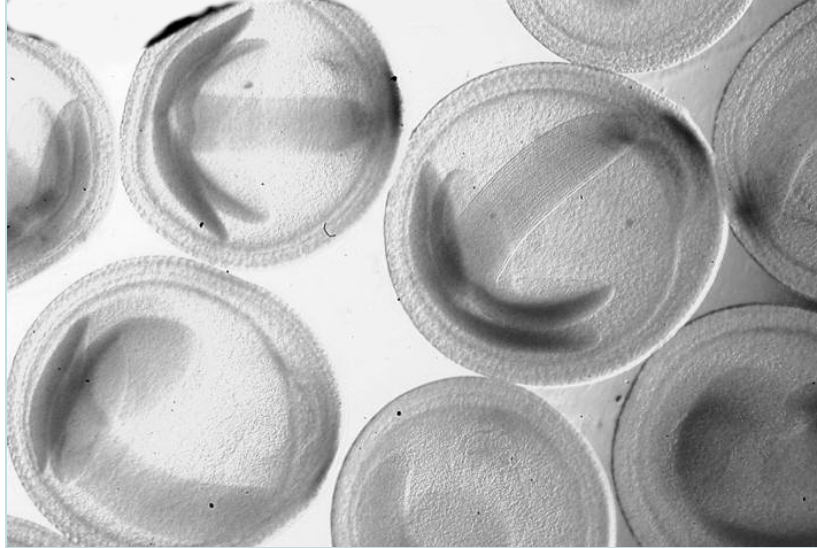
Z kolei w zwrotnych krzyżowaniach rzepiku Yellow Sarson z *B. carinata* efektywność krzyżowań była wyższa w przypadku użycia Yellow Sarson jako formy matecznej. Po zapyleniu roślin odmiany Yellow Sarson nienaświetlanym pyłkiem *B. carinata* efektywność wyniosła 37,5%, a w krzyżowaniach gdzie formę mateczną stanowiła *B. carinata* efektywność ta wyniosła 11,0%. Podobną tendencję w efektywności krzyżowania obserwowano po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniami UV-C (tab. 5 i 6).



Fot. 1–6. Zalążki roślin *Brassica* po ich prześwietleniu salicylanem metylu — *Ovules of Brassica plants after clearing with methyl salicylate*

Zalążki *B. napus* (odmiana Topas) z zarodkami powstałymi po zapyleniu pyłkiem *B. campestris* ssp. *trilocularis* (Yellow Sarson) traktowanym promieniowaniem UV-C, 15 dzień po zapyleniu. Widoczne zarodki różnych stadiów rozwojowych od wczesno- i późno-globularnych (1–3) do wczesnej i późnej torpedy (4–6).

Ovules B. napus (Topas variety) with embryos emerging after pollination with B. campestris ssp. trilocularis (Yellow Sarson) pollen treated with UV-C radiation, 15th day after pollination. Visible embryos of different developmental stages from early- and late-globular (1–3) to the early and late torpedo (4–6).



Fot. 7. Zalążki *B. napus* (odmiana Topas) z zarodkami powstałymi po zapyleniu pyłkiem *B. napus* (odm. White Flower) traktowanym promieniowaniem UV-C, 15 dzień po zapyleniu. W zalążkach widoczne zarodki stadium prawie dojrzałego — *Ovules B. napus* (*Topas variety*) with embryos arising after pollination with *B. napus* (*White Flower variety*) pollen treated with UV-C radiation, 15th day after pollination. In ovules visible embryos in nearly matured developmental stage

Tabela 5

Efektywność krzyżowania międzygatunkowego rzepiku jarego (*B. campestris* — Yellow Sarson) z rzepakiem jarym (*B. napus* — White Flower) i gorczycą etiopską (*B. carinata*)
*Effectiveness of interspecific crosses of spring turnip rape (*B. campestris* — Yellow Sarson) with spring oilseed rape (*B. napus* — White Flower) and with *B. carinata**

Forma ojcowska <i>Paternal form</i> ♂	Kombinacja	Procent żywych zalążków po określonej liczbie dni od zapylenia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Per cent of living ovules after the determined number of days after pollination with reference to the average number of ovules in the pistil*</i>		Procent zalążków żywych zawierających zarodki po określonej liczbie dni od zapylenia <i>Per cent of living ovules containing embryos after the determined number of days after pollination</i>		Efektywność zapłodnienia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Effectiveness of fertilizing ovules with reference to the average number of ovules in the pistil</i> [%]
		10 dni — <i>days</i>	15 dni — <i>days</i>	10 dni — <i>days</i>	15 dni — <i>days</i>	
<i>B. napus</i> cv. White Flower	1	1	55,0	55,0	4,5	72,7
	2	2	62,5	52,5	16,0	28,6
	3	3	57,5	42,5	26,1	47,1
	4	4	57,5	55,0	39,1	40,9
	5	5	50,0	35,0	80,0	42,9
	6	6	47,5	57,5	36,8	26,1
	7	7	57,5	57,5	73,9	82,6
	8	8	57,5	52,5	43,5	33,3
	9	9	62,5	52,5	8,0	23,8
	K	K	47,5	45,0	31,6	38,9
<i>B. carinata</i>	1	1	47,5	45,0	52,6	105,6
	2	2	57,5	55,0	91,3	100,0
	3	3	45,0	40,0	66,7	100,0
	4	4	67,5	67,5	48,1	100,0
	5	5	45,0	35,0	44,4	78,6
	6	6	62,5	52,5	100,0	71,4
	7	7	60,0	62,5	45,8	96,0
	8	8	50,0	45,0	70,0	88,9
	9	9	60,0	45,0	70,8	100,0
	K	K	52,5	60,0	76,2	58,3

* — średnia liczba zalążków w słupku u odmiany Yellow Sarson = 20,0
mean number of ovules in the pistil of the variety Yellow Sarson = 20.0

Tabela 6

Efektywność krzyżowania międzygatunkowego gorczycy etiopskiej (*B. carinata*) z rzepakiem jarym (*B. napus* — White Flower) i rzepikiem jarym (*B. campestris* — Yellow Sarson) — *Effectiveness of interspecific crosses of B. carinata with spring oilseed rape (B. napus — White Flower) and with spring turnip rape (B. campestris — Yellow Sarson)*

Forma ojcowska <i>Paternal form</i> ♂	Kombinacja	Procent żywych zalążków po określonej liczbie dni od zapylenia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Per cent of living ovules after the determined number of days after pollination with reference to the average number of ovules in the pistil*</i>		Procent zalążków żywych zawierających zarodki po określonej liczbie dni od zapylenia <i>Per cent of living ovules containing embryos after the determined number of days after pollination</i>		Efektywność zapłodnienia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Effectiveness of fertilizing ovules with reference to the average number of ovules in the pistil</i> [%]
		10 dni — <i>days</i>	15 dni — <i>days</i>	10 dni — <i>days</i>	15 dni — <i>days</i>	
<i>B. napus</i> cv. White Flower	1	22,1	4,9	66,7	100,0	9,8
	2	7,4	7,4	100,0	33,3	4,9
	3	14,7	9,8	66,7	100,0	9,8
	4	24,5	2,5	0,0	100,0	1,2
	5	31,9	22,1	23,1	100,0	14,7
	6	29,4	34,3	50,0	35,7	13,5
	7	31,9	22,1	76,9	55,6	18,4
	8	9,8	0,0	50,0	0,0	2,5
	9	14,7	4,9	0,0	100,0	2,5
	K	2,5	0,0	100,0	0,0	1,2
<i>B. campestris</i> ssp. <i>trilocularis</i> cv. Yellow Sarson	1	7,4	2,5	100,0	100,0	4,9
	2	4,9	0,0	50,0	0,0	1,2
	3	14,7	2,5	50,0	0,0	3,7
	4	14,7	14,7	33,3	16,7	3,7
	5	14,7	4,9	50,0	100,0	6,1
	6	7,4	7,4	33,3	33,3	2,5
	7	0,0	7,4	0,0	100,0	3,7
	8	12,3	4,9	40,0	0,0	2,5
	9	14,7	2,5	100,0	100,0	8,6
	K	34,3	22,1	0,0	100,0	11,0

* — średnia liczba zalążków w słupku u gorczycy etiopskiej (*B. carinata*) = 20,4
mean number of ovules in the pistil of Ethiopian mustard (B. carinata) = 20.4

Podobnie jak w wewnątrzgatunkowych krzyżowaniach odmian rzepaku jarego, tak i w krzyżowaniu męskosterylnej linii rzepaku ozimego z ozimą odmianą Lisek efektywność krzyżowania była stosunkowo wysoka i po zapyleniu nienaświetlanym pyłkiem wyniosła 59,4%, a po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniowaniem UV-C wyniosła 46,9–82,3% w zależności od kombinacji (tab. 7).

Wśród wszystkich kombinacji krzyżowań oddalonych najniższą efektywność obserwowano w krzyżowaniu linii MS-8 z kalarepą (*B. oleracea* var. *gongyloides*), gdzie jedynie w dwóch kombinacjach zapylenia, tj. pyłkiem nienaświetlanym i pyłkiem traktowanym UV-C (3 kombinacja) jedynie 3,1 i 2,1% zalążków zawierało zarodki.

Tabela 7
Efektywność krzyżowania męskosterylnej linii rzepaku ozimego MS-8 (*B. napus*) z odmianą Lisek i z kalarepą (*B. oleracea* var. *gongyloides*) — *Effectiveness of crosses of male sterile line MS-8 of winter oilseed rape (B. napus) with Lisek variety and with kohlrabi (B. oleracea var. gongyloides)*

Forma ojcowska <i>Paternal form</i> ♂	Kombinacja	Procent żywych zalążków po określonej liczbie dni od zapylenia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku*		Procent zalążków żywych zawierających zarodki po określonej liczbie dni od zapylenia		Efektywność zapłodnienia w odniesieniu do średniej liczby zalążków w słupku* <i>Effectiveness of fertilizing ovules with reference to the average number of ovules in the pistil</i> [%]
		<i>Per cent of living ovules after the determined number of days after pollination with reference to the average number of ovules in the pistil*</i>		<i>Per cent of living ovules containing embryos after the determined number of days after pollination</i>		
		10 dni – <i>days</i>	15 dni – <i>days</i>	10 dni – <i>days</i>	15 dni – <i>days</i>	
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>biennis</i> cv. Lisek	1	62,5	64,6	66,7	80,6	46,9
	2	95,8	68,8	95,7	54,5	64,6
	3	83,3	87,5	35,0	95,2	56,3
	4	97,9	91,7	72,3	72,7	68,8
	5	85,4	81,3	97,6	89,7	78,1
	6	89,6	79,2	95,3	100,0	82,3
	7	79,2	72,9	78,9	80,0	60,4
	8	95,8	85,4	69,6	65,9	61,5
	9	95,8	77,1	76,1	75,7	65,6
	K	83,3	81,3	57,5	87,2	59,4
<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i> cv. Herkules	1	6,3	4,2	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
	3	12,5	2,1	16,7	100,0	2,1
	4	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	14,6	8,3	0,0	0,0	0,0
	7	12,5	6,3	0,0	0,0	0,0
	8	8,3	2,1	0,0	0,0	0,0
	9	2,1	2,1	0,0	0,0	0,0
	K	8,3	2,1	75,0	0,0	3,1

* — średnia liczba zalążków w słupku linii MS-8 (*B. napus*) = 24,0
mean number of ovules in the pistil of MS-8 line (B. napus) = 24.0

Dyskusja

Prezentowane badania miały na celu ocenienie możliwości osłabienia żywotności pyłku poprzez napromieniowanie UV i zbadanie jak ten czynnik będzie wpływał na proces zapłodnienia oraz rozwój zarodka. Pod tym kątem obserwowano intensywność kiełkowania ziaren pyłku, wzrost łagiewek pyłkowych w słupku oraz zarodki otrzymane w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych.

Promieniowanie UV, jak już wspomniano wcześniej, występuje w trzech zakresach długości fal: UV-A, UV-B i UV-C. Zastosowane w pracy promieniowanie UV-C (lampa emitująca fale o długości 253,7 nm) jest w sposób naturalny blokowane przez warstwę ozonową i nie dociera do powierzchni ziemi, tak długo jak ta zostanie zachowana (Caldwell i in. 1989). Wykorzystywane jest natomiast w badaniach nad mikroorganizmami, roślinami i zwierzętami, ponieważ, tak jak i pozostałe zakresy promieniowania, wpływa na zmiany w kwasach nukleinowych (mutacje) oraz fizjologię organizmów (Stapleton 1992). Promieniowanie jest silnie pochłaniane przez DNA, a dodatkowa wysoka energia fotonów UV-C doprowadza do szybkiego i rozległego wystąpienia zmian w jego budowie. W związku z tym, że niewiele jest prac naukowych traktujących o wpływie tego zakresu fal na pyłek, w dyskusji przeprowadzone zostanie odwołanie do prac nad promieniowaniem UV-B, jako najbardziej zbliżonym pod względem długości emitowanej fali.

Pierwsze prace dotyczące promieniowania ultrafioletowego jako czynnika wpływającego na rośliny wyższe, powstały już w połowie lat 30. XX w. (Stadler i Sprague 1936, cyt. za Fujii 1969). Natomiast w ostatnim dwudziestolecu w związku ze wzrastającym ciągle poziomem promieniowania UV-B docierającego do powierzchni ziemi poprzez malejącą powłokę ozonową, naturalnym wydało się wzmożone zainteresowanie badaczy prowadzeniem doświadczeń we wzmiankowanej kwestii. Dowiedziono m.in., że nawet mały wzrost w poziomie promieniowania UV-B w sposób wyraźny oddziałuje na rośliny, gdyż te przez cały czas są poddawane ekspozycji promieniowania słonecznego (Barnes i in. 1990). Jednocześnie, bezpośrednio z procesami wzrostu i rozwoju reprodukcyjnego powiązać można wiele biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych skutków promieniowania UV, które zależą m.in. od wrażliwości danej rośliny i warunków środowiskowych (Chesnokov i Mantueffel 2000). Wpływ promieniowania UV badany był częściej w relacji z wegetatywnymi częściami roślin, rzadziej analizowano jego wpływ na organy i procesy reprodukcyjne. Odnotowano m.in. zmniejszenie liczby liści, ich masy i powierzchni pod wpływem wzmożonego UV-B (Krupa i Kickert 1989), czy też zwiększenie masy korzeni pod wpływem zredukowania poziomu napromieniowania (Ruhland i in. 2005). Natomiast dużą część z zakresu doświadczeń nad rozmnażaniem się roślin poświęcono analizie męskiego gametofitu czyli pyłku, jego rozwojowi oraz wzrostowi łagiewek pyłkowych.

W prezentowanej pracy efekty większości zapyleń pyłkiem potraktowanym UV-C, bez względu na zastosowaną dawkę promieniowania, nie odbiegały znacząco od wyników uzyskanych dla kontroli. Takie rezultaty napromieniowania odnotowano w krzyżowaniach White Flower \times *B. carinata*, *B. carinata* \times *B. campestris* ssp. *trilocularis*, *B. campestris* ssp. *trilocularis* \times White Flower, Topas \times *B. campestris* ssp. *trilocularis* oraz w poszczególnych kombinacjach innych krzyżówek. Brak różnic również obserwowali w swoich pracach Santos i in. (1998), którzy hodowali kukurydzę naświetlaną promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym (PAR) w połączeniu z UV-B oraz samym PAR. Po umieszczeniu pyłku na pożywce okazało się, że kiełkowanie pyłku traktowanego i kontrolnego przebiega identycznie. Zauważyli jednak opóźnienie kwitnienia o 2–3 dni, zmiany w dojrzewaniu pylników oraz ultrastrukturze samego pyłku. Natomiast Musil (1995) wykazał, że promieniowanie UV-B nie miało wpływu na rozwój pyłku w roślinach z rodziny kosaćcowatych.

W niniejszej pracy stwierdzono w odniesieniu do niektórych kombinacji krzyżowań i dawek UV-C korzystny wpływ napromieniowania, co potwierdza wyniki prac dotyczącymi innych gatunków, gdzie stymulujący efekt promieniowania UV-B również został zauważony (m.in. Jordan 1996, Mackerness i in. 1999). Z kolei doświadczenia szklarniowe wyłącznie nad przedstawicielami rodzaju *Brassica*, dotyczące ich zdolności do rozmnażania, w przypadku *Brassica rapa* sugerują obniżoną produkcję żywotnego pyłku pod wpływem zwiększonego poziomu promieniowania UV-B, co może skutkować ograniczeniami w zapyleniu oraz zapłodnieniu i co za tym idzie, zmniejszeniem liczby nasion (Demchik i Day 1996). Czy wobec powyższego można uzasadnić tak odmienne efekty napromieniowania, a mianowicie stymulację zaobserwowaną w przeprowadzonym eksperymencie? Niejednorodność wyników może być spowodowana rozbieżnością w genotypach zastosowanych roślin i w związku z tym przeciwstawną reakcją na promieniowanie UV, czy też poszczególne jego dawki. Pogląd ten jest zgodny z opiniami badaczy sugerującymi, że pomiędzy odmianami, populacjami i gatunkami istnieją duże różnice w reagowaniu na ten czynnik (Barnes i in. 1993, Caldwell i in. 1995, Dai i in. 1994). Inną przyczyną wyjaśniającą ten fakt może być długość fali promieniowania, przy czym w cytowanych opracowaniach jest to przedział 280–320 nm (zakres UV-B), a w niniejszym 253,7 nm (UV-C).

Metoda prześwietlania zalążków zastosowana w niniejszej pracy okazała się bardzo skuteczna i stosunkowo łatwa w stosowaniu i umożliwia ocenę efektywności krzyżowania roślin, przydatną zwłaszcza w krzyżowaniach oddalonych. Oszacowana na tej podstawie efektywność wykonanych krzyżowań oddalonych potwierdza dość oczywisty dla hodowców fakt, że kierunek wykonanych krzyżowań ma dość często znaczący wpływ na wyniki prowadzonych prac. W prezentowanej pracy taki wyraźny wpływ kierunku krzyżowania szczególnie zaznaczył się w krzyżowaniach *B. napus* \times *B. carinata*, gdzie w przypadku użycia *B. napus* jako formy matecznej średnio ponad 42% zalążków zawierało zarodki, a w krzyżowaniach odwrotnych,

gdzie *B. carinata* stanowiła formę mateczną zaledwie ok. 8% zalążków zawierało zarodki. Podobną zależność obserwowano w krzyżowaniach *B. carinata* × *B. campestris* (Yellow Sarson). W tym przypadku po zapyleniu *B. carinata* pyłkiem Yellow Sarson zaledwie 4,8% zalążków zawierało zarodki, a w krzyżowaniach odwrotnych ponad 41% zalążków zawierało zarodki. Dane otrzymane w niniejszej pracy znajdują potwierdzenie również w innych pracach dotyczących krzyżowania oddalonego w rodzaju *Brassica*. W tym względzie np. Röbbelen (1966) krzyżując *B. campestris* × *B. oleracea* wykazuje 17,1% efektywność, a z krzyżowań *B. oleracea* × *B. campestris* — 3,2%. Z kolei Wojciechowski (1985) w krzyżowaniach dwóch wymienionych wyżej gatunków uzyskał efektywność odpowiednio 9,9 i 0,1%. Różne efekty krzyżowań uzyskane przez autorów mogą być wyjaśnione różnicami genetycznymi pomiędzy roślinami rodzicielskimi użytymi w krzyżowaniach.

Wnioski

1. Zastosowana w pracy metoda prześwietlania zalążków przy użyciu salicylanu metylu może być z powodzeniem stosowana do obserwacji rozwoju zarodka oraz oceny jego fazy rozwojowej, co może być bardzo przydatne przy podejmowaniu decyzji o momencie izolacji zarodka i jego dalszej hodowli w kulturach *in vitro*.
2. Efektywność krzyżowań oddalonych w poszczególnych kombinacjach była zróżnicowana. W niektórych przypadkach krzyżowań zwrotnych efektywność ta była uzależniona od tego, która z krzyżowanych form stanowiła formę mateczną.
3. Na podstawie otrzymanych danych nie udało się jednoznacznie stwierdzić w jaki sposób wpływ czasu od momentu zapylenia wpływał na rozwój zarodka. W zależności od kombinacji krzyżowań w 15 dniu od zapylenia obserwowano większy bądź mniejszy odsetek zalążków zawierających zarodki w porównaniu z danymi otrzymanymi z obserwacji wykonanych w 10 dniu od zapylenia.

Literatura

- Barnes P.W., Flint S.D., Caldwell M.M. 1990. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany*, 77: 1354-1360.
- Barnes P.W., Maggard S., Holman S.R., Vergara B.S. 1993. Intraspecific variation in sensitivity to UV-B radiation in rice. *Crop Science*, 33: 1041-1046.

- Caldwell M.M., Teramura A.H., Tevini M. 1989. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends in Evolution and Ecology*, 4: 363-367.
- Caldwell M.M., Teramura A.H., Tevini M., Bornman J.F., Björn L.O., Kulandaivelu G. 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio*, 24: 166-173.
- Chesnokov Y.V., Manteuffel R. 2000. Dose effect of UV-B irradiation on pollen tube growth and seed-specific promoter activities in irradiated pollen grains of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Sex Plant Reproduction*, 12: 361-364.
- Dai Q., Peng S., Chavez A.Q., Vergara B.S. 1994. Intraspecific responses of 188 rice cultivars to enhanced UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 34: 433-442.
- Demchik S.M., Day T.A. 1996. Effects of enhanced UV-B radiation on pollen quantity, quality, and seed yield in *Brassica rapa* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 83: 573-579.
- Fujii T. 1969. Photoreactivation of mutations induced by ultraviolet radiation of maize pollen. *Radiation Botany*, 9: 115-123.
- Jordan B.R. 1996. The Effects of Ultraviolet-B Radiation on Plants: A Molecular Perspective. *Advances in Botanical Research*, 22: 98-162.
- Kakani V.G., Reddy K.R., Zhao D., Sailaja K. 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120: 191-218.
- Kravets E.A., Grodzinsky D.M., Gushcha N.I. 2008. Influence of UV-B Radiation on the Reproductive Function of *Hordeum vulgare* L. plants. *Cytology and Genetics*, 42 (5): 294-299.
- Krupa S.V., Kickert R.N. 1989. The greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B radiation, carbon dioxide and ozone on vegetation. *Environmental Pollution*, 61: 263-393.
- Mackerness S.A.H., Jordan B.R., Thomas B. 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet – B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 48: 180-188.
- Musil C.F. 1995. Differential effects elevated ultraviolet-B radiation on the photochemical and reproductive performances of dicotyledonous and monocotyledonous ephemerals. *Plant, Cell and Environment*, 18: 844-854.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2004. Cleared-ovule technique used for rapid access to early embryo development in *Secale cereale* x *Zea mays* crosses. *Acta Biologica Cracoviensia*, 46: 133-137.
- Röbbelen G. 1966. Beobachtungen bei interspezifischen *Brassica*-Kreuzungen, insbesondere über die Entstehung matromorpher F₁ – Pflanzen. *Angew. Bot.*, 39: 205-221.
- Ruhland C.T., Xiong F.S., Clark W.D., Day T.A. 2005. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology*, 81: 1086-1093.
- Santos A., Almeida J.M., Santos I., Salema R. 1998. Biochemical and Ultrastructural Changes in Pollen of *Zea mays* L. Grown Under Enhanced UV-B Radiation. *Annals of Botany*, 82: 641-645.
- Stapleton A.E. 1992. Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *The Plant Cell*, 4: 1353-1358.
- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea*. I. Effectiveness of crossing. Observations of pollen tube growth. The course of embryogenesis. *Genetica Polonica*, 26/4: 423-436.