

Katarzyna Sosnowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu

Wykorzystanie krzyżowania oddalonego do poszerzania zmienności genetycznej w rodzaju *Brassica* sp.

The usage of distant crosses for the extension of genetic variation in *Brassica* sp.

Słowa kluczowe: krzyżowanie oddalone, resynteza rzepaku, kultury zarodków, bariery prezygotyczne i postzygotyczne.

Krzyżowanie roślin genetycznie oddalonych pozwala na wprowadzenie korzystnych cech z form dzikich do form uprawnych. Niezgodność genetyczna występująca między krzyżowanymi gatunkami często uniemożliwia efektywne krzyżowanie i tym samym powstawanie pożądanych mieszańców. Niezgodność ta może ujawnić się w różnych stadiach cyklu rozmnażania. Wyróżniamy dwie kategorie ograniczające krzyżowanie międzygatunkowe czy międzyrodzajowe: prezygotyczne i postzygotyczne. Bariery te często udaje się przezwyciężyć np. poprzez zapylanie *in vitro* izolowanych zalążków (ominięcie barier prezygotycznych) czy hodowlę w warunkach *in vitro* mieszańcowych zarodków bądź zapylonych zalążków i zalążni (ominięcie barier postzygotycznych). Wspomniane metody pokonywania barier krzyżowalności zostały z powodzeniem wykorzystane w krzyżowaniu międzygatunkowym czy międzyrodzajowym w obrębie rodzaju *Brassica*. Metoda krzyżowania oddalonego wykorzystywana jest do: tworzenia systemów męskiej sterylności {mającej duże znaczenie w hodowli heterozyjnej}, wprowadzania odporności na choroby i szkodniki, otrzymywania żółtej barwy nasion rzepaku (z którą łączy się obniżona zawartość włókna) oraz w celu modyfikacji składu kwasów tłuszczowych. Resynteza rzepaku (*Brassica napus* L.) przy wykorzystaniu diploidalnych gatunków podstawowych: rzepiku (*Brassica rapa* L.) i kapusty (*Brassica oleracea* L.), w celu poszerzenia zakresu zmienności genetycznej, jest także przykładem praktycznego wykorzystania krzyżowania oddalonego. Dzięki dużej liczbie blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Brassica* oraz dostępnym ogromnym zasobom plazmy zarodkowej w bankach genów możliwa jest introgresja poprzez krzyżowanie oddalone, nowych, korzystnych cech do materiału hodowlanego rzepaku.

Key words: distant crossing, resynthesis of oilseed rape, embryo culture, pre-zygotic and post-zygotic barriers

The crossing of genetically distant plants allows for the introduction of beneficial economical traits from wild to cultivated plants. The genetic incompatibility often prevents an effective crossing between two species and thus the formation of desirable hybrids. Incompatibility may occur at different stages of reproductive cycle. There are two types of barriers which prevent interspecific or intergeneric crosses: pre-zygotic and post-zygotic. These barriers can be sometimes overcome by *in vitro* direct pollination of isolated ovules (pre-zygotic barriers) by on media culture of hybrid embryos, ovules or ovaries containing embryos (post-zygotic barriers). These methods of overcoming crossing barriers

have been successfully used in interspecies and intergeneric crosses within the genus *Brassica*. The method of distant crossing is used in *Brassica napus* breeding for hybrid breeding and cytoplasmic male sterility (which is of great importance in heterosis), for implementing improved resistance to diseases and pests, obtaining yellow seed character (which involves reduced fiber content) and for modification of fatty acid composition. Resynthesis of rapeseed (*Brassica napus* L.) from diploid species, such as turnip rape (*Brassica rapa* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.), performed in order to extend the genetical variability is also a good example of practical application of distant crossing. Due to a large number of closely related species of the genus *Brassica* and available enormous resources of germplasm in gene banks, introgression by distant crossing of new features, beneficial for oilseed rape breeding material, is possible.

Wstęp

Rośliny mieszańcowe, powstałe z krzyżowania form oddalonych, odgrywają dużą rolę w badaniach genetycznych, taksonomicznych i hodowli roślin. Mieszańce płciowe, powstałe wskutek krzyżowania generatywnego, wykorzystywane są do otrzymania nowych gatunków roślin, nowych odmian lub linii hodowlanych po wprowadzeniu określonej cechy (Stefaniak 2004). Krzyżowanie roślin uprawnych z gatunkami dzikimi umożliwia zmianę cech jakościowych i ilościowych danego gatunku, na przykład: odporności na patogeny (bakterie, wirusy), zwiększenie tolerancji roślin na niekorzystne warunki środowiskowe (np. tolerancja na suszę, mrozoodporność). Ponadto krzyżowanie często prowadzi do tworzenia allopoliploidów, powstania haploidów, stymuluje apomiksję. Wzbogacenie zmienności u roślin uprawnych o określoną jedną lub kilka cech, uwarunkowanych jednym bądź kilkoma genami, jest jednym z zadań programów hodowlanych (Malepszy i in. 1989). Metoda krzyżowania form genetycznie oddalonych jest szeroko wykorzystywana w wytwarzaniu materiałów wyjściowych dla hodowli roślin, jakkolwiek nie zawsze uzyskanie mieszańców oddalonych jest łatwe ze względu na występujące bariery pre- i postzygotyczne.

U *Angiospermeae* gametofit żeński położony jest głęboko w załączni, a łagiewka pyłkowa zanim dotrze do woreczka załączkowego musi pokonać długą drogę poprzez komórki znamienia i szyjki słupka. Istnienie mechanizmów uniemożliwiających krzyżowanie międzygatunkowe czy międzyrodzajowe sprawia, że mimo stosowania różnych metod, rzadko udaje się uzyskać wartościowe mieszańce (zarodki i rośliny), ze względu na kombinację cech obojga rodziców (Zenkter 1984). Przyczyną trudności w krzyżowaniu roślin mogą być zbyt duże różnice genetyczne pomiędzy obydwoma rodzicami. Pokolenia potomne łatwiej jest uzyskać, gdy krzyżuje się gatunki o zbliżonej puli genowej. Olsson (1960) zaobserwował, że krzyżowanie w obrębie rodzaju *Brassica* udaje się częściej, gdy forma macezna ma większą liczbę chromosomów niż forma ojcowska. Wiele krzyżowań oddalonych w obrębie roślin nasiennych nie udaje się z powodu: niezdolności kielkowania pyłku na obcym znamieniu, zbyt krótkich łagiewek

niedochodzących do zalążków, słabego i powolnego wzrostu łagiewek, pęknięcia łagiewek i sterylności mieszańców. Można temu zapobiec wykorzystując technikę hodowli zalążni *in vitro* (Zenkteler i Guzowska 1967).

Niezgodność genetyczna występująca między gatunkami może ujawniać się w różnych momentach cyklu rozmnażania: gdy pyłek znajduje się na znamieniu, podczas przerastania łagiewki przez komórki szyjki, w momencie zapłodnienia (bariery prezygotyczne) lub w czasie embriogenezy (bariery postzygotyczne) (Zenkteler 2007).

Barriere prezygotyczne

Barriere prezygotyczne mogą być spowodowane przyczynami genetyczno-fizjologicznymi, gdy pyłek na znamieniu obcego słupka nie tworzy łagiewki pyłkowej albo łagiewka zamiera lub nie jest w stanie dotrzeć do komórki jajowej, bądź przyczynami morfologicznymi, w przypadku gdy wielkość komórek znamienia, długość i budowa anatomiczna słupka są przeszkodą dla zbyt krótkiej łagiewki pyłkowej. Występowanie bariery prezygotycznej uniemożliwia zapłodnienie komórki jajowej, czyli zapobiega powstaniu zygoty (Zenkteler 2007).

Istnieje kilka możliwości przezwyciężenia barier prezygotycznych:

- zapylenie niedojrzałych słupków,
- opóźnione zapylenie (kilka dni po otwarciu kwiatu),
- działanie na słupki podwyższoną temperaturą (co może prowadzić do rozpadu lub inaktywacji czynników rozpoznania w słupku),
- naświetlanie słupków promieniami X,
- zapylenie słupków mieszaniną pyłków zgodnych i niezgodnych (gdzie pyłek zgodny jest inaktywowany promieniami UV),
- działanie na powierzchnię znamienia wyciągiem ze ściany pyłku zgodnego,
- przemywanie znamion tuż przed zapyleniem gorącą wodą celem unieczynienia glikoprotein,
- odcięcie znamion,
- zapylenie wewnątrzzałążniowe (bezpośrednia iniekcja pyłku, w postaci suchej bądź zawiesiny, do zalążni),
- zapylenie placentowe i zapłodnienie *in vitro* (Bednarska 1994).

Dla ominięcia barier prezygotycznych można zastosować zapylenie *in vitro* izolowanych zalążków, umieszczonych na łożysku (zapylenie placentowe). Znaczącą rolę odgrywa tu dobór odpowiedniej pożywki, która powinna być na tyle uniwersalna, aby umożliwiła hodowlę zalążka, kiełkowanie pyłku i równocześnie dostarczyła potrzebnych związków dla rozwijającego się prazarodka, zarodka i bielma (Zenkteler i Guzowska 1967). Pierwsze zakończone powodzeniem doświadczenia z zapyleniem *in vitro* przeprowadzono w Indiach z zalążkami *Papaver rhoes* (Kanta i Maheswari 1963). Do zapyień *in vitro* najbardziej podatne okazały się

rośliny z rodzaju: *Papaver*, *Nicotiana*, *Melandrum*, *Petunia* itp. (Malepszy i in. 1989). Największą liczbę roślin mieszańcowych w wyniku oddalonego zapylania zalążków *in vitro* uzyskuje się w rodzinach *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae* i *Liliaceae* (Zenkter 2007).

Przykładem ominięcia barier prezygotycznych u *Brassica* jest krzyżowanie *Brassica napus* z *Brassica campestris*. Zamknięte pąki kwiatowe pobierano 24 h przed otwarciem kwiatu. Następnie izolowano i sterylizowano słupki oraz przecinano zalążnie. Na odkryte zalążki nakładano pyłek *B. campestris*. Takie zapylone zalążnie umieszczano na pożywce MS (Murashige i Skoog 1962). Po upływie 15–21 dni od zapylenia z powiększonych zalążków izolowano niedojrzałe zarodki i umieszczano je na pożywce B5 (Gamborg i in. 1968), a z nich rozwijały się zdrowe rośliny mieszańcowe (Zenkter i in. 1987). Innym przykładem jest krzyżowanie *Brassica oleracea* × *Brassica cretica*. W doświadczeniu tym metodyka zapylenia przebiegała podobnie. Po 4–6 dniach od zapylenia część zalążni i zalążków powiększyła się. Analiza embriologiczna powiększonych zalążków wykazała zarodki i bielmo w różnych stadiach rozwoju. Po 14–18 dniach od zapylenia wykładano zarodki na świeżą pożywkę, na której rozwijały się rośliny, następnie wysadzane do gleby (Zenkter 1991).

Bariery postzygotyczne

Bariery postzygotyczne (pozapłodnieniowe) to takie, w których zakłócenia mają miejsce w okresie od syngamii do powstania dojrzałego zarodka. Zaburzenia we wczesnych stadiach prowadzą do: zamierania zarodka, eliminacji chromosomów, wadliwego kiełkowania niedorozwiniętych nasion, braku żywotności w pokoleniu F₁, męskiej sterility, zamierania mieszańców (Malepszy 1989).

Olsson (1960) oraz Wojciechowski (1985) wykazali, iż najczęstszą przyczyną zamierania zarodków w obrębie *Brassica* jest niepełny rozwój bielma. Innym zaburzeniem pozapłodnieniowym jest nadmierny przerost tkanki somatycznej, która odcina dopływ substancji odżywczych dla rozwijającego się zarodka (Wojciechowski 1985). W takich przypadkach pomocna okazała się: hodowla mieszańcowych zarodków w warunkach *in vitro* we wczesnym stadium rozwoju, a także hodowla w warunkach *in vitro* zapylonych zalążków (Zenkter 2007). Dzięki temu możliwe stało się otrzymywanie mieszańców międzygatunkowych i międzyrodzajowych.

Wyizolowany z niekorzystnego środowiska zarodek (pozbawiony substancji odżywczych w wyniku niewykształcenia bielma), przeniesiony do nowych, stymulujących warunków stwarza możliwość przejścia przez dalsze stadia rozwojowe i uzyskania rośliny. Zarodki można poddać kulturze *in vitro* bez izolacji, umieszczając zalążnie, zalążki z łożyskiem lub pojedyncze zalążki na

pożywcze kilka dni po zapyleniu. Zaletą takiej metody jest mała pracochłonność oraz nieuszkodzenie małych zarodków. Kulturę izolowanych zalążków zastosował m.in. Maheshwari (1958), była ona skuteczna dla małych, dwukomórkowych zarodków *Papaver somniferum* (Malepszy 1989).

Dzięki rozwojowi metod kultur *in vitro*, a szczególnie opracowaniu metody kultury zarodków mieszańcowych we wczesnym stadium rozwoju — embrio rescue — możliwe jest uzyskiwanie roślin u *Brassica* poprzez krzyżowanie międzygatunkowe na szeroką skalę, przewyższając bariery pre- i postzygotyczne.

Krzyżowanie oddalone w obrębie rodzaju *Brassica* sp.

Badania nad krzyżowaniem oddalonym u *Brassica* zapoczątkowali Karpechenko (1924) oraz U (1935), który w wyniku krzyżowania *Brassica rapa* z *Brassica oleracea* dokonał resyntezy rzepaku *Brassica napus* L. Od tego czasu mieszańce oddalone wykorzystywane w badaniach i hodowli rzepaku uzyskuje się tą metodą.

Cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS)

Najbardziej spektakularne z punktu widzenia przydatności dla hodowli rzepaku jest wykorzystanie krzyżowań oddalonych dla tworzenia systemów męskiej sterylności wykorzystywanych w hodowli odmian mieszańcowych, u których występujący efekt heterozji pozwala na uzyskanie wyższej plonów.

W obrębie rodzaju *Brassica* możemy wyróżnić kilka źródeł genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterylności. Pochodzą one z mieszańców wewnątrzgatunkowych, międzygatunkowych, międzyrodzajowych lub są wynikiem spontanicznych mutacji (Bartkowiak-Broda 1991). Genowo-cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS) typu *ogura*, opisana przez Ogura (1968) w genotypie japońskiej rzodkwi *Raphanus sativus*, jest jednym z najczęściej wykorzystywanych systemów kontrolujących zapylenie krzyżowe u rzepaku w celu produkcji nasion mieszańcowych. Męskosterylny rzepak ze sterylną cytoplazmą „S” pochodzącą od *Raphanus sativus* otrzymano poprzez krzyżowanie międzygatunkowe roślin CMS *ogura* z *Brassica oleracea* (Bannerot i in. 1974), a następnie z *Brassica napus* (Cauderon cyt. wg Rousselle 1982). U *Brassica napus* nie występują geny restorery dla CMS *ogura*, dlatego zostały one wprowadzone do genotypu rzepaku poprzez krzyżowanie z *Raphanobrassica* (Heyn 1976). W ten sposób otrzymano materiał wyjściowy do hodowli odmian mieszańcowych rzepaku, jakkolwiek wymagał on jeszcze dalszych ulepszeń — zwiększenia zawartości chlorofilu w liniach CMS (Pelletier i in. 1987) oraz ulepszenia plenności linii restorerów (Pellan-Delourme 1986) i ich cech jakościowych (Popławska i in. 2001). Obecnie większość programów hodowlanych w Europie, także w Polsce, wykorzystuje system CMS *ogura* do hodowli odmian mieszańcowych, których uprawa zapewnia średnio o 10% wyższe plony niż uprawa odmian populacyjnych.

Odporność na choroby i szkodniki

Dzięki krzyżowaniu oddalonemu możliwe stało się wprowadzenie do form uprawnych cech odporności na choroby, szkodniki oraz tolerancję na warunki stresowe. Corocznie pojawianie się porażań rzepaku, wywoływane przez patogeny (głównie grzybowe) i związane z tym znaczne obniżenie plonu nasion stymuluje prowadzenie intensywnych prac dążących do podwyższenia odporności nowo otrzymanych odmian. W rodzaju *Brassica sp.* występuje wiele gatunków, które mają cenne cechy użytkowe, np. *Brassica hirta* charakteryzuje się odpornością na nicienie i suszę, *B. tournefortii* — odpornością na choroby grzybowe i mszyce, a *B. fruticulosa* odpornością na słodyszka rzepakowego (Wojciechowski i in. 2006). Wojciechowski i in. (1997) uzyskali rośliny mieszańcowe, charakteryzujące się podwyższoną odpornością na choroby grzybowe po skrzyżowaniu *B. napus* z *B. fruticulosa*.

Jedną z najbardziej rozpowszechnionych i najgroźniejszych chorób rzepaku w Polsce i na świecie jest sucha zgnilizna kapustnych, wywołana przez *Leptosphaeria maculans*. Krzyżowanie międzygatunkowe czy międzyrodzajowe pozwala na przeniesienie odporności na suchą zgniliznę z innych roślin kapustowatych do rzepaku (np. z *Sinapis arvensis* — Snowdon i in. 2000, z *Coincya monensis* — Winter i in. 2003). Roussell i in. (1999) oraz Somda i in. (1999) uzyskali mieszańce międzygatunkowe rzepaku z *B. nigra* i *B. juncea*, z kolei po wielu krzyżowaniach wstecznych — linię MXS *B. napus*, trwale odporną na *L. maculans*. Natomiast odporność na tego patogena przeniesiono także do zresyntetyzowanego amfidiploida, powstałego w wyniku międzygatunkowej hybrydyzacji między *B. rapa* subsp. *sylvestris* i *B. oleracea* subsp. *alboglabra* (Crouch i in. 1994). Całkowicie odporną na suchą zgniliznę kapustnych odmianę rzepaku, Surpass 400, uzyskano właśnie poprzez resyntezę *Brassica napus* w 2001 roku w Australii (Yu i in. 2008).

Inna choroba, powodowana przez *Verticillium longisporum*, wywołuje także poważne straty plonu w Szwecji, Wlk. Brytanii oraz w północnej części Niemiec zagraża również polskim plantacjom. Formy tego grzyba mogą utrzymywać się w glebie przez ponad dziesięć lat, dlatego alternatywą dla skutecznej kontroli choroby w krótkim płodozmianie jest hodowla odmian odpornych. Niewielka odporność na choroby u rzepaku ozimego i jarego wymaga poszukania źródeł odporności u gatunków spokrewnionych (Friedt i Snowdon 2009). Happstadius i in. (2003) w swoich doświadczeniach dokonali przeniesienia odporności na *Verticillium* z *B. oleracea* do *B. napus*.

Rygulla i in. (2007) przeprowadzili natomiast połączenie odporności z *B. oleracea* i *B. rapa*, wykorzystując zasoby genowe z ośmiu banków genów oraz odmiany, w nowym resyntetyzowanym (RS) *B. napus* za pomocą metod hybrydyzacji międzygatunkowej oraz embryo rescue *in vitro*. Spośród 45 linii RS 41 wykazało wyższą odporność na *V. longisporum* niż wzorcowa odmiana. W ten sposób otrzymano nowe źródło odporności na tę ważną chorobę rzepaku. Rośliny RS

uzyskane poprzez hybrydyzację międzygatunkową pomiędzy *B. rapa* i *B. oleracea* stanowią potencjalne źródło odporności na omawiany patogen grzybowy w puli genowej rzepaku. Większość *B. oleracea* posiada wysoką odporność na choroby, ale także wysoki poziom kwasu erukowego i glukozyzolanów w nasionach, co zmniejsza użyteczność powstałych linii RS w hodowli (Rygulla i in. 2007). Autorzy ci po skrzyżowaniu zeroerukowego mutantu *B. oleracea* convar. *capitata* z rzepikiem jarym (*B. rapa* ssp. *oleifera*) otrzymali jednak zeroerukowe linie RS, z umiarkowaną zawartością glukozyzolanów.

Kiła kapuściana, wywoływana przez grzyba *Plasmodiophora brassicae*, dotyka około 10% całkowitej powierzchni hodowanych na całym świecie roślin z rodzaju *Brassica*, powodując znaczne straty plonu. Choroba ta atakuje system korzeniowy rośliny, powodując powstanie niekształtnych, guzowatych narośli, które z czasem ciemnieją i gniją. Wzrost chorych roślin jest bardzo osłabiony, mają obniżoną zimotrwałość, a podczas upałów więdną i zamierają. Diederichsen i in. (1996) z powodzeniem dokonali przeniesienia odporności na *Plasmodiophora brassicae* do *Brassica napus* po skrzyżowaniu *B. rapa* z *B. oleracea*.

Pierwszą odmianą odporną na kiłę była na rynku odmiana Mendel F1 (*B. rapa* × odporna *B. oleracea*), pochodząca z niemieckiej hodowli NPZ-Lembke. Otrzymano ją poprzez skrzyżowanie linii kapusty z linią rzepiku, wykorzystując kulturę zalążni. Po podwojeniu chromosomów otrzymano linię rzepaku RS (AACC), którą skrzyżowano z odmianą Falcon. Z tego mieszańca wyprowadzono linie DH, wśród nich wyselekcjonowano linię odporną na *Plasmodiophora brassicae*, która była materiałem wyjściowym do wyhodowania odmiany Mendel F1, inne linie wykorzystano do hodowli odmiany Tosca, odpornej na inne patotypy (Friedt i Snodown 2009).

Żółtonasiennność

Żółtonasiennność u *Brassica napus* nie występuje w naturze (Liu i in. 1991). Cechę tę jednak obserwuje się u innych uprawianych i dziko rosnących gatunków z rodzaju *Brassica*, np. żółtonasiennego rzepiku (*B. rapa*) uprawianego w Chinach (Jiang i in. 2007) oraz żółtonasiennych form allotetraploidalnych *Brassica* (Rahman 2001). Wydaje się zatem, że skrzyżowanie gatunków spokrewnionych o żółtej czy brązowej barwie nasion spowoduje introgresję tej cechy (Zaman 1988). Z żółtą barwą nasion łączy się podwyższona zawartość tłuszczu w całych nasionach i białka w śrucie oraz obniżona zawartość włókna, co polepsza wartość odżywczą śruty pozostałej po ekstrakcji tłuszczu. Cecha ta jest bardzo pożądana i świadczy o celowości hodowli w kierunku poprawy cech jakościowych rzepaku (Rahman 2001, Ochodzki i Piotrowska 2002). Mutanty jasnonasienne występujące u rzepaku nie nadają się do hodowli komercyjnej. Dlatego do rzepaku amfidiploidalnego wprowadzano geny żółtonasienności poprzez krzyżowania oddalone z gatunkami diploidalnymi. Żółtonasienny rzepak otrzymali Liu i Gao (1987) poprzez krzyżowanie jasnonasiennej linii *B. napus* z *B. rapa* ssp. *chinensis*, ale uzyskana linia charakteryzowała się niepełną żółtą barwą oraz małą stabilnością tej cechy

w kolejnych pokoleniach. Baetzel i in. (1999) uzyskali żółtonasienny rzepak drogą krzyżowania jasnonasiennej *B. oleracea* z żółtonasiennym *B. rapa*. Cecha żółtonasienności została również wprowadzona do *B. napus* z *B. carinata* (Rashid i in. 1994, Rahman 2001) oraz z *B. juncea* (Rashid i in. 1994). Bechyne (1999) krzyżując *B. rapa* z żółtonasiennym *B. napus* (uzyskanym z *B. oleracea* (CC) o ciemnożółtych nasionach \times *B. rapa* (AA) yellow sarson) otrzymał rzepak o żółtej okrywie nasiennej. Zamierzeniem drugiego krzyżowania było ewentualne przeniesienie genów żółtonasienności z genomów A *Brassica rapa* do genomów A i C *Brassica napus*. Wszystkie rośliny otrzymane w pokoleniu F₁ posiadały morfologię *B. napus* i wydawały ciemne nasiona. W pokoleniu F₂ z 1772 roślin 6 odznaczało się pożądanymi cechami, co oznacza, że taki złożony transfer jest możliwy.

Żółtonasienne linie rzepaku ozimego otrzymano także w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych IHAR-PIB w Poznaniu, po skrzyżowaniu naturalnego mutanta, znalezionej w materiałach hodowlanych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego z linią rzepaku jarego, otrzymaną w wyniku krzyżowania *B. napus* \times *B. rapa* (otrzymaną z Kanady). W następstwie chowu wsobnego, krzyżowania z najlepszymi rodami ciemnonasiennego rzepaku ozimego i selekcji wyprowadzono żółtonasienne linie (Piotrowska i in. 2000). W celu ustabilizowania żółtej barwy nasion oraz ulepszania cech jakościowych i agronomicznych prowadzona jest dalsza hodowla (Piotrowska i in. 2000).

Modyfikacja składu kwasów tłuszczowych

Resynteza rzepaku poprzez krzyżowanie oddalone różnych podgatunków *B. campestris* z *B. oleracea* staje się także jednym ze sposobów na modyfikację składu kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym (Lu i in. 2001).

Wszystkie obecne odmiany rzepaku podwójnie ulepszanego posiadają w swoim genotypie geny determinujące brak kwasu erukowego pochodzące od linii zeroerukowych jarej pastewnej odmiany Liho, a geny niskiej zawartości glikozynolanów od odmiany rzepaku jarego Bronowski, co powoduje znaczne zawężenie zmienności genetycznej odmian tego gatunku. Dlatego w kolekcjach rodzaju *Brassica* poszukuje się nowych źródeł zmienności. Znalezione trzy rośliny mutanty kapusty *B. oleracea* conv. *capitata* w obrębie odmian Kashirka 202, Ladozhskaya DS. 8395 i Eisenkopf. Rośliny te zostały skrzyżowane z roślinami rzepiku *B. rapa* odmiany Asco, także nie zawierającymi kwasu erukowego. W wyniku zastosowania kultury *in vitro* załazni otrzymano resyntetyczny rzepak o śladowej zawartości kwasu erukowego (Seyis i in. 2005). Otrzymany w ten sposób genotyp może służyć jako nowe źródło zmienności tak dla hodowli jakościowej jak i dla ulepszenia plenności.

Resynteza rzepaku

Obecnie dość często dokonuje się resyntezy rzepaku z gatunków podstawowych, ponieważ u rzepaku uprawnego nie stwierdzono form „dzikich”, a *Brassica napus* L., posiadający genom AACC (2n = 38), jest naturalnym amfidiploidem,

powstałym w wyniku spontanicznego krzyżowania między diploidalnymi gatunkami *Brassica rapa* ($2n = 20$, genom AA) i *Brassica oleracea* ($2n = 18$, genom CC).

Jednym ze sposobów poszerzania genetycznych zasobów do hodowli rzepaku jest sztuczne uzyskiwanie rzepaku resyntetyzowanego (RS) poprzez krzyżowanie gatunków podstawowych *B. oleracea* i *B. rapa*. Potencjalnie jest źródłem nie tylko poszerzającym zmienność genetyczną rzepaku, która została ograniczona przede wszystkim w wyniku hodowli odmian rzepaku podwójnie ulepszonych, ale także, jak już wspomniano źródłem odporności na choroby i szkodniki (Friedt i Snodown 2009).

Przykładem resyntezy rzepaku ozimego było krzyżowanie odległych genetycznie gatunków *Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *chinensis* z *Brassica oleracea* ssp. *acephala* var. *sabellica* (Sosnowska i in. 2010). Otrzymane rośliny po przeniesieniu do gleby poddawano badaniu zawartości jądrowego DNA za pomocą analizy cytometrii przepływowej, w celu potwierdzenia ich mieszańcowości. Ocena cech morfologicznych (rys. 1) i cytometryczna analiza jądrowego DNA otrzymanych roślin potwierdziły ich mieszańcowy fenotyp i genotyp. Analiza molekularna przeprowadzona przy użyciu 20 starterów RAPD wykazała odrębność resyntetyzowanych roślin *Brassica napus* uzyskanych z krzyżowania, od linii DH i odmian rzepaku ozimego obecnie hodowanego i uprawianego (Sosnowska i in. 2010). Resynteza rzepaku w celu zwiększenia puli genowej przeprowadzona została również przez Jesske i in. (2011). Uzyskali oni 40 linii RS krzyżując *B. rapa* z dzikimi formami *B. oleracea* (*B. bougeaui*, *B. cretica*, *B. incana*, *B. montana*, *B. repenstris* itp.), które wzbogaciły pulę genetyczną materiałów hodowlanych rzepaku.



Rys. 1. Porównanie liści form rodzicielskich i mieszańca (od lewej: *Brassica rapa*, *B. rapa* × *B. oleracea*, *Brassica oleracea*)

Podsumowanie

Klasyczne metody hodowli jakościowej umożliwiły jak dotąd otrzymanie odmian rzepaku o zróżnicowanych cechach jakościowych. Natomiast dalsze modyfikacje *Brassica napus*, wiążące się z wyprowadzeniem materiałów wyjściowych do hodowli oraz rodów hodowlanych posiadających pożądane, nowe cechy, jak pokazały przytoczone przykłady, możliwe są dzięki zastosowaniu metod biotech-

nologicznych, ułatwiających przełamywanie barier krzyżowalności oraz dzięki wykorzystaniu metod biologii molekularnej.

Duża liczba blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Brassica* oraz dostępne ogromne zasoby plazmy zarodkowej w bankach genów umożliwiają introgresję poprzez krzyżowanie oddalonych nowych cech jakościowych i ilościowych do materiału hodowlanego rzepaku.

Literatura

- Baetzel R., Friedt W., Voss A., Lühs H. 1999. Development of yellow seeded high erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.). 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, CD.
- Bannerot H., Boulidard L., Cauderon Y., Tempe J. 1974. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. Proc. Eucarpia Meeting – Cruciferae, 25-27 Sept.: 52-54.
- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej nieplodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. *oleifera*. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 35 (3/4): 3-60.
- Bechyne M., 1999. Development of four-valved yellow seeded rapeseed. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 4: 1147-1149.
- Bednarska E. 1994. Zarys embriologii roślin okrytonasiennych. Wydawnictwo UMK Toruń, 55-64.
- Crouch J.H., Lewis B.G., Mithen R.F. 1994. The effect of A genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*. Plant Breeding, 112: 265-278.
- Diederichsen E., Sacristan M.D. 1996. Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae*. Wor. Plant Breeding, 115: 5-10.
- Friedt W., Snowdon R. 2009. Oilseed Rape. Ed. J. Vollmann, I. Rajcan. Oil Crops. Springer, 91-126.
- Gamborg O., Miller R., Ojina K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res., 150, 151-158.
- Happstadius I., Ljungberg A., Kristiansson B., Dixelius C. 2003. Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to *Verticillium* wilt. Plant Breeding, 122: 30-34.
- Heyn F.W. 1976. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. Cruciferae Newsletter, Eucarpia, 1: 15-16.
- Jesske T., Olberg B., Becker H.C. 2011. Resynthesized rapeseed with *Brassica* species as new genetic resource for breeding. 13th Inter. Rapeseed Congress, Prague, Czech Republic, CD, 816-819.
- Jiang J., Niu Y., Yu Q., Guo S. 2007. Variation in seed colour and relationship to oilcontending a yellow-seeded landraces in *Brassica rapa* L. Proc. 12th Int. Rapeseed Congress, Wuhan, Chiny, 1: 163-165.
- Kanta K., Maheswari P. 1963. Intraovarian Pollination in some *Papaveraceae*. Phytomorphology, 13: 215-229.
- Karpechenko G.D. 1924. Hybrids of *Raphanus sativus* × *Brassica oleracea*. I. J. Genet., 14: 375-396.
- Liu H.L., Gao Y.T. 1987. Some fundamental problems conducted from the studies on the breeding of yellow seeded *Brassica napus* L. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, Poland, 2: 476-491.
- Liu H., Han J., Hu X. 1991. Studies on the inheritance of seedcoat color and other related characters of yellow-seeded *Brassica napus*. Proc. 8th Int. Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada, 1438-1444.
- Lu C.M., Zhang B., Kakihara F., Kato M. 2001. Introgression of genes into cultivated *Brassica napus* through resynthesis of *B. napus* via ovule culture and the accompanying change in fatty acid composition. Plant Breeding, 120: 405-410.

- Maheshwari N. 1958. *In vitro* culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. Science, 127: 342.
- Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., Przybecki Z. 1989. Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 81-140.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures. Plant Physiol., 15: 473-497.
- Ochodzki P., Piotrowska A. 2002. Właściwości fizyczne i skład chemiczny nasion rzepaku ozimego o różnym kolorze okrywy nasiennej. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXIII (2): 235-241.
- Ogura H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrids seeds. Mem. Fac. Agric. Ragostrima Univ., 6 (2): 39-78.
- Olsson G. 1960. Species Crosses within the genus *Brassica*. II. Artificial *Brassica napus* L. Hereditas, 46: 351-386.
- Pellan-Delourme R. 1986. Etude de deux systèmes de stérilité male génocyttoplasmique introduits chez le colza (*Brassica napus* L.) par croisements intergénériques avec *Raphanus* et *Diplotaxis*. These INRA-Rennes: 88.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chétrit P., Pellan-Delourme R., Renard M., Mesquida J. 1987. Molecular, phenotypic and genetic characterization of mitochondrial recombinants in rapeseed. Proc. 7th Int. Rapeseed Conference, Poznań, Poland, 1: 113-118.
- Piotrowska A., Krótka K., Krzymański J. 2000. Wartość gospodarcza żółtonasiennych linii rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XIX (2): 359-366.
- Popławska W., Bartkowiak-Broda I., Liersch A., Fürguth A. 2001. Ocena jakościowa linii restorerów dla CMS *ogura* i ich przydatność do tworzenia zrestorowanych mieszańców pokolenia F₁ rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXII (2): 335-348.
- Rahman M.H. 2001. Production of yellow seed *Brassica napus* interspecific crosses. Plant Breeding, 120: 463-472.
- Rashid A., Rakow G., Downey R.K. 1994. Development of yellow seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. Plant Breeding, 112: 127-134.
- Roussel S., Nicole M., Lopez F., Renard M., Chevre A.M., Brun H. 1999. Cytological investigation of resistance to *Leptosphaeria maculans* conferred to *Brassica napus* by introgressions originating from *B. juncea* or *B. nigra* B genome. Phytopathology, 89 (12): 1200-1213.
- Rousselle P. 1982. Premiers résultats d'un programme d'introduction de l'androsterilité „Ogura” du radis chez le colza. Agronomie, 2 (9): 859-864.
- Rygulla W., Friedt W., Seyis F., Lühs W., Eynck C., Tiedemann A., Snowdon R.J. 2007. Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines. Plant Breeding, 126, 6: 596-602.
- Rygulla W., Snowdon R.J., Eynck C., Koopmann B., Tiedemann A., Lühs W., Friedt W. 2007. Broadening the Genetic Basis of *Verticillium longisporum* Resistance in *Brassica napus* by Interspecific Hybridization. The American Phytopathological Society, 97, 11: 1391-1396.
- Seyis F., Friedt W., Lühs W. 2005. Development of resynthesized Rapeseed (*Brassica napus* L.) Forms with Low Erucic Acid Content Through in ovulum Culture. Asian Journal of Plant Sciences, 4 (1): 6-10.
- Somda I., Delourme R., Renard M., Brun H. 1999. Pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* isolates on a *Brassica napus* – *B. juncea* recombinant line. Phytopathology, 89 (2): 169-175.

- Snowdon R.J., Winter H., Diestel A., Sacristan M.D. 2000. Development and characterization of *Brassica napus* – *Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Teor. Appl. Genet.*, 101: 1008-1014.
- Sosnowska K., Szała L., Olejnik A., Cegielska-Taras T. 2010. Preliminary study on resynthesis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXXI (2): 257-266.
- Stefaniak B. 2004. Komórki roślinne w warunkach stresu. 2. Komórki in vitro. *Red. A. Woźny, K. Przybył. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.*
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J. Bot.*, 7: 389-452.
- Winter H., Diestel A., Gärtig S., Krone N., Sterenberg K., Sacristan M.D. 2003. Transfer of new blackleg resistances into oilseed rape. *Proc. 11th Int. Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark*, 1: 19-21.
- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. and *B. oleracea* L. I. Effectiveness of crossing, Pollen Tube Growth, Embriogenesis. *Genetica Polonica*, 26/4: 423-436.
- Wojciechowski A., Nowak K., Olejniczak J. 1997. Wstępne wyniki krzyżowań międzygatunkowych pomiędzy *Brassica napus*, *B. oleracea*, *B. campestris* i *B. fruticulosa*. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVIII: 91-98.
- Wojciechowski A., Olejniczak J., Springer B. 2006. Otrzymywanie międzygatunkowych mieszańców w rodzaju *Brassica* z zastosowaniem kultur *in vitro*. W: *PAGEN Centre of Excellence in Plant Agrobiolology and Molecular Genetics „Mieszańce oddalone roślin uprawnych”*. *Red. W. Sodkiewicz, T. Sodkiewicz, M. Surma. Instytut Genetyki Roślin PAN*, 7: 107-114.
- Yu F., Lydiate D.J., Rimmer S.R. 2008. Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *Genome*, 51: 64-72.
- Zaman M.W. 1988. Limitations for introgression of yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Sveriges Utsadesförenings Tidskrift*, 99: 205-207.
- Zenkter M. 1984. *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN, Warszawa: 209-258.
- Zenkter M. 2007. *Kultura zalążków, zalążni i zarodków*. W: *Biotechnologia roślin*. *Red. S. Malepszy. PWN, Warszawa*, 70-87.
- Zenkter M. 1991. Ovule culture and test tube fertilization. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Genet.*, 56 (4a): 1403-1410.
- Zenkter M., Guzowska I., 1967. O niektórych zagadnieniach eksperymentalnej embriologii roślin, *Wiadomości botaniczne*, t. XI z. 4.
- Zenkter M., Maheswaran G., Williams E.G. 1987. *In vitro* placental pollination in *Brassica campestris* and *B. napus*. *J. Plant. Physiol.*, 128: 245-250.