

ZASTOSOWANIE KULTUR *in vitro* ZARODKÓW I ZALĄŻKÓW W POKONYWANIU POST-ZYGOTYCZNYCH BARIER W RODZAJU *Brassica*

Błażej Springer, Andrzej Wojciechowski, Małgorzata Pieśkiewicz

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

Wstęp

W licznych pracach genetyczno-hodowlanych obserwuje się rosnące zainteresowanie tworzeniem mieszańców oddalonych, które są cennym materiałem wyjściowym dla hodowli roślin. Poszukuje się wartościowych cech u spokrewnionych dzikich form, w celu przeniesienia ich do form uprawnych na drodze krzyżowania oddalonego. Uzyskane pokolenie mieszańcowe ma szansę dziedziczyć pożądane cechy obojga rodziców. Otrzymywanie roślin mieszańcowych z krzyżowań oddalonych jest jednak ograniczone ze względu na istnienie barier pre- i post-zygotycznych. Jednym z efektów występowania barier post-zygotycznych krzyżowania oddalonego jest zamieranie zarodków mieszańcowych we wczesnych stadiach embriogenezy. Bariery te można pokonać wykorzystując kultury *in vitro*.

Celem pracy była ocena możliwości pokonania barier post-zygotycznych występujących przy krzyżowaniu oddalonym wybranych gatunków z rodzaju *Brassica* stosując kultury *in vitro* izolowanych zarodków i zalążków.

Materiał i metody

Wykonano krzyżowania zwrotne pomiędzy trzema gatunkami: *B. fruticulosa* (CYR.) $2n = 16$, *B. campestris* (L.) ssp. *sarson* (PRAIN) $2n = 20$ i *B. napus* (L.) var. *oleifera* (METZG.) $2n = 38$. W przypadku rzepaku (*Brassica napus*) użyto dwie odmiany jare 'Topas' i 'White Flower'. Gatunki użyte do krzyżowań z rzepakiem posiadają ważne użytkowe cechy, które mogą poszerzyć zmienność genetyczną tego gatunku. *B. fruticulosa* to gatunek dziki charakteryzujący się silnym systemem samoniezgodości i odpornością na choroby i szkodniki. *B. campestris* ssp. *sarson* – rzepik jary, posiada ważną z użytkowego punktu widzenia cechę – żółtą okrywą nasienną.

Ogółem wykonano 6 kombinacji krzyżowań. Kastrację przeprowadzano w stadium pąka kwiatowego, a zapylenie wykonywano bezpośrednio po kastracji. Dla każdego krzyżowania wykonano 4 warianty zapyłania:

wariant A-pyłek naniesiony na znamię słupka,
 wariant B-pyłek umieszczony na słupku po odcięciu znamienia,
 wariant C-pyłek naniesiony w połowie odciętej szyjki słupka,
 wariant D-pyłek naniesiony na załącznię po uprzednim usunięciu szyjki słupka.

Dla wszystkich kombinacji krzyżówkowych w każdym wariantcie zapylenia dokonano oceny płodności. Płodność obliczono ze stosunku liczby otrzymanych łuszczyn do liczby zapyłanych kwiatów. W kombinacjach krzyżowania, w których zarodki osiągały co najmniej stadium sercowe, prowadzono kultury izolowanych zarodków. Zarodki izolowano 14–21 dni po zapyleniu w zależności od kombinacji krzyżowania. W krzyżowaniach, w których zarodki zamierały przed upływem 14 dni od zapylenia posłużono się kulturami załączków. Załączki pobierano i wykładano na pożywki między 5 a 13 dniem od zapylenia. Hodowlę załączków i zarodków prowadzono w pokoju hodowlanym przy fotoperiodzie 16/8 godzin, w temperaturze 25°C i oświetleniu 4500 luxów.

Kultury zarodków i załączków prowadzono na pożywkach WHITE (W) [1963], MURASHIGE i SKOOG (MS) [1963], MURASHIGE i SKOOG zmodyfikowanej przez KELLER'A i in. (MS_k) [1975] oraz NITSCH i NITSCH (H₃) [1969]. Wybór pożywki inicjującej uzależniony był od stadium rozwojowego zarodka. Zarodki izolowane w stadium serca umieszczano na pożywce W i po 7 dniach przenoszono na pożywkę MS. Starsze zarodki umieszczano bezpośrednio na pożywce MS. Zarodki, które na pożywce MS rozwinęły pędy nie wykształcały korzonków zarodkowych. Dlatego po 3–4 tygodniach inkubacji umieszczano je na ukorzeniającej pożywce H₃. W przypadku, gdy zarodki formowały struktury nienormalne, prowadzono dodatkowo 1–3 prostny pasaż na pożywce MS_k zanim pędy umieszczono na pożywce H₃. Podobnie postępowano z izolowanymi załączkami, które bezpośrednio po izolacji umieszczano na pożywce W. Po 7 dniach inkubacji załączki otwierano, a otrzymane zarodki w zależności od stadium rozwojowego umieszczano na pożywce W lub MS.

W celu zwiększenia wydajności regeneracji odcinano fragmenty pędów regenerujących roślin pochodzące z późniejszych etapów kultur (pożywka MS, H₃) i przenoszono je na oddzielne pożywki różnicujące i ukorzeniające.

Wyniki i dyskusja

A. Ocena skuteczności krzyżowania (tab. 1)

Dwie kombinacje krzyżówkowe (*B. napus* × *B. campestris* i *B. campestris* × *B. napus*) zawiązały łuszczyny we wszystkich wariantach kontrolowanego zapylenia. W przypadku krzyżowania *B. napus* z *B. campestris* największą płodność otrzymano w wariantcie C zapylenia (66,7%), a najniższą w wariantcie B (34%). Krzyżowanie zwrotne tych gatunków odznaczało się najwyższą płodnością w wariantcie B (62,5%) a najniższą w D (50%).

W krzyżowaniu *B. campestris* × *B. fruticulosa* łuszczyny zawiązało 7,1% zapylnych kwiatów w wariantcie A zapylenia. Pozostałe warianty zapylenia w tym krzyżowaniu nie skutkowały wiązaniem łuszczyn. W krzyżowaniu *B. fruticulosa* × *B. campestris* otrzymano łuszczyny tylko w wariantach A (płodność 6,4%) i B (płodność 15,4%). Wariant D w krzyżowaniach zwrotnych *B. napus* z *B. fruticulosa* nie wykazał płodności. W pozostałych wariantach zapylenia tej kombinacji

krzyżówkowej, w przypadku gdy formą maticzną była *B. napus*, największą liczbę łuszczyń obserwowano przy zapyłaniu na znamię (16,7%) a najniższą, gdy pyłek nanoszono na odciętą w połowie szyjkę (6,7%). W przypadku, gdy formą maticzną była *B. fruticulosa* obserwowano odwrotną zależność – największa płodność w wariantcie C zapyłania (14,8%) a najmniejsza w A (5,3%).

B. Ocena wyników kultur zarodków i załączków (tab. 1)

Z 6 kombinacji krzyżówkowych otrzymano 229 załączków, z których wyizolowano 43 zarodki w sadium sercowatym i torpedy.

W pełni rozwinięte rośliny mieszańcowe uzyskano z 4 kombinacji krzyżowań (tab. 1). Były to: *B. napus* × *B. fruticulosa* (6 zregenerowanych roślin), *B. fruticulosa* × *B. napus* (1 roślina), *B. napus* × *B. campestris* (23 rośliny), *B. campestris* × *B. napus* (1 roślina + 2 rośliny sklonowane). W sumie otrzymano 31 roślin co stanowi 72% zarodków umieszczonych na pożywkach.

W krzyżowaniach zwrotnych *B. fruticulosa* i *B. campestris* nie otrzymano ani jednej rośliny. W krzyżowaniu tych gatunków zarodki mieszańcowe zamierały przed osiągnięciem stadium serca. Zastosowano więc kultury załączków. Załączki z tej kombinacji krzyżówkowej umieszczano na pożywkach po 3–5 dniach od zapyłania, jednak nie podejmowały one rozwoju. Pozytywny efekt w kulturach załączków obserwowano jedynie w krzyżowaniu zwrotnym *B. napus* × *B. campestris*; otrzymano rośliny z obu kierunków krzyżowań. Ogółem w kulturach załączków zregenerowało 27 roślin w tym 21 w przypadku, gdy formą maticzną była *B. napus*.

Technika hodowli zarodków w kulturach *in vitro* została po raz pierwszy zastosowana przez LAIBACHA [1925] dla otrzymania roślin mieszańcowych w rodzaju *Linum*. Znaczenie kultur zarodkowych doceniono kiedy OVERBEEK i in. [1941] zaobserwowali, że mleczko kokosowe dodane do pożywki stymuluje wzrost zarodków. Dziś powszechnie uważa się, że oswobodzenie zarodka z niekorzystnego środowiska i przeniesienie na odpowiednie pożywki *in vitro* jest szansą rozwoju rośliny mieszańcowej, a czynniki takie jak: genotyp, stadium rozwojowe zarodków w momencie izolacji, warunki wzrostu rośliny maticznej, skład pożywki i warunki inkubacji odgrywają kluczową rolę w skuteczności zarodkowych kultur *in vitro* [WOJCIECHOWSKI i in. 1997]. Według wielu badaczy [NISHIYAMA, INOMATA 1966; MALEPSZY 1989; NOWAK 1996] w krzyżowaniach oddalonych lepszą skutecznością krzyżowania oddalonego charakteryzują się kombinacje, w których roślina maticzna jest na wyższym poziomie ploidalności. Podobną zależność obserwowano w prezentowanej pracy.

W rodzaju *Brassica* po raz pierwszy kultury zarodkowe zostały zastosowane przez NISHIEGO i in. [1959]. Od tego czasu są często używane dla otrzymania mieszańców oddalonych w rodzaju *Brassica*. Za pomocą kultur zarodkowych udało się między innymi otrzymać mieszańce oddalone z takich krzyżowań jak: *B. juncea* × *B. napus* [BAJAJ i in. 1986], *B. albolabra* × *B. campestris* [CHEN i in. 1988] czy *B. campestris* × *B. chinensis* [ANGIHORTI i in. 1990, cyt. za WOJCIECHOWSKI 1998].

W krzyżowaniach oddalonych, zarodki często zamierają we wczesnych stadiach rozwojowych. Pomocne mogą być wtedy kultury załączkowe. Kultury załączków pozwalają zachować naturalne środowisko rozwijającym się zarodkom i uchronić je przed uszkodzeniem i stresem spowodowanym izolacją [POPIELARSKA, PRZYWARA 1997]. Ważne jest, aby nie dopuścić do degeneracji załączków.

Skuteczność krzyżowania oddalonego u gatunków *Brassica*; Effectiveness of wide hybridization of *Brassica* species

Kombinacja krzyżowania Crossing combination		<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>				
		wariant zapylenia pollination variant	huszczyny* siliques* (%)	liczba załążków number of ovules	liczba wyłożo- nych zarodków number of pla- ted embryos	liczba roślin uzyska- nych z zarodków number of plants obtained from plated embryos	liczba wyłożo- mych załążków number of pla- ted ovules	liczba roślin uzyska- nych z załążków number of plants obtained from plated ovules
forma matecz- na; female parent form	forma ojcows- ka; male parent form							
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i>	<i>B. fruticulosa</i>	A	16,7	87	7	6	80	0
	<i>B. fruticulosa</i>	B	11,1	2	1	0	1	0
	<i>B. fruticulosa</i>	C	6,7	2	1	0	1	0
	<i>B. fruticulosa</i>	D	0	0	0	0	0	0
	<i>B. campestris</i>	A	40,3	70	11	7	59	21
	<i>B. campestris</i>	B	34,1	14	14	12	0	0
	<i>B. campestris</i>	C	66,7	0	0	0	0	0
	<i>B. campestris</i>	D	41	6	6	4	0	0
<i>B. fruticulosa</i>	<i>B. napus</i>	A	5,3	12	2	1	10	0
	<i>B. napus</i>	B	5,4	0	0	0	0	0
	<i>B. napus</i>	C	14,8	0	0	0	0	0
	<i>B. napus</i>	D	0	0	0	0	0	0
	<i>B. campestris</i>	A	6,4	5	0	0	5	0
	<i>B. campestris</i>	B	15,4	3	0	0	3	0
	<i>B. campestris</i>	C	0	0	0	0	0	0
	<i>B. campestris</i>	D	0	0	0	0	0	0
<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	<i>B. napus</i>	A	56,2	9	1	1	8	6
	<i>B. napus</i>	B	62,5	0	0	0	0	0
	<i>B. napus</i>	C	55,5	0	0	0	0	0
	<i>B. napus</i>	D	50	0	0	0	0	0
	<i>B. fruticulosa</i>	A	7,1	19	0	0	19	0
	<i>B. fruticulosa</i>	B	0	0	0	0	0	0
	<i>B. fruticulosa</i>	C	0	0	0	0	0	0
	<i>B. fruticulosa</i>	D	0	0	0	0	0	0

* zawiązywanie młodych huszczyn w stosunku do liczby zapylnych kwiatów; setting of young siliques in relation to the number of pollinated flowers

WOJCIECHOWSKI i in. [2001] stwierdzili, że najlepszy moment dla izolowania załóżków u *Brassica* przypada między 10 a 30 dniem od zapylenia i jest on najbardziej zależny od krzyżowanych genotypów. W prezentowanej pracy zarodki izolowano między 14 a 20 dniem od zapylenia. Odpowiadało to stadium serca lub torpedy w rozwoju zarodka. W niektórych kombinacjach krzyżowań zarodki zamierały przed osiągnięciem stadium serca. Dla ratowania wcześniej zamierających zarodków zastosowano kultury załóżkowe. Kultury załóżkowe w wielu przypadkach mają przewagę nad kulturami zarodków, gdyż bardzo młode zarodki mogą korzystać zarówno z egzogennych jak i endogennych źródeł odżywczych.

Z dużym sukcesem kultury załóżkowe w rodzaju *Brassica* prowadzili WOJCIECHOWSKI i in. [2001]. Autorzy ci wykorzystali kultury *in vitro* zarodków i załóżków do otrzymania roślin z krzyżowań oddalonych pomiędzy różnymi formami gatunków *B. campestris*, *B. oleracea*, *B. napus* i *B. fruticulosa*. Kultury załóżkowe umożliwiły otrzymanie roślin mieszańcowych w kombinacjach krzyżówkowych, w których zarodki zamierały już kilka dni od zapylenia. Były to kombinacje: *B. campestris* ssp. *chinensis* × *B. oleracea* var. *italica* oraz *B. napus* × *B. oleracea* var. *italica*.

W prezentowanych badaniach w kulturach załóżków otrzymano zregenerowane rośliny tylko z krzyżowań zwrotnych *B. napus* i *B. campestris*. Zregenerowane rośliny z krzyżowań tych dwóch gatunków uzyskano również przy zastosowaniu kultur zarodkowych.

Wnioski

1. Wykazano możliwość pokonania barier post-zygotycznych metodą kultur *in vitro* zarodków i załóżków w krzyżowaniu trzech gatunków *Brassica*. Zregenerowane rośliny uzyskano tylko w niektórych kombinacjach krzyżowania.
2. W kulturach załóżków otrzymano mieszańce z krzyżowań zwrotnych *Brassica napus* × *Brassica campestris*.
3. W kulturach zarodków najczęściej zregenerowanych roślin otrzymano z krzyżowania zwrotnego *Brassica napus* × *Brassica campestris*, mniej z krzyżowania zwrotnego *Brassica napus* × *B. fruticulosa*.

Literatura

ANGIHORTI A., LAKSHMIKUMARAN M., SHIVANNA K.R., JAGANNATHAN V. 1990. *Embryo rescue of interspecific hybrids of Brassica sinensis x Brassica campestris and DNA analysis. Progres in plant cellular and molecular biology*. Eds. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas, Aartrijk J. Van Kluwer. Amsterdam: 270–274.

AYOTTE R., HARNEY P.M., MAHADO S. 1987. *The transfer of triazine resistance from Brassica napus L. to Brassica oleracea L. I. Production of F1 hybrids through embryo rescue*. Euphytica 36: 615–624.

BAJAJ Y.P.S., MAHAJAN S.K., LABANA K.S. 1986. *Interspecific hybridization of Brassica napus and Brassica juncea through ovary, ovule and embryo culture*. Euphytica 35:

103–109.

CHEN B.Y., HENEEN W.K., JONSSON R. 1988. *Resynthesis of Brassica napus L. Through interspecific hybridization between B. alboglabra Bailey and Brassica campestris L. with special emphasis on seed colour*. Plant Breed. 101: 52–59.

LAIBACH F. 1925. *Das Taub Werden von Bastardsamen und die Kustliche Aufzucht fruh Absterbender Bastardembryonen*. Zeitsch. Bot. 17: 417–459 (cytowane za AYOTTE i in. 1987).

KELLER W.A., RAJHATHY T., LACAPRA J. 1975. *In vitro production of plants from pollen in Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17: 655–666.

MALEPSZY S. 1989. *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. PWN Warszawa.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473–497.

NISHI S., KAWATA J., TODA M. 1959. *In the breeding of interspecific hybrids between two genomes "c" and "a" of Brassica through the application of embryo culture techniques*. Japan J. Breed. 8: 215–225.

NISHIYAMA I., INOMATA N. 1966. *Embriological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x Brassica*. Jpn. J. Genet. 41: 27–42.

NITSCH J. P., NITSCH C., HAMON S. 1969. *Production de Nicotiana diploids a partir de cals haploides cultives in vitro*. C.R. Acad. Sci. Paris 269: 1275–1278.

NOWAK K. 1996. *Otrzymywanie mieszańców oddalonych poprzez krzyżowanie wybranych genotypów rodzaju Brassica*. Praca magisterska AR Poznań.

POPIELARSKA M., PRZYWARA L. 1997. *Kultury in vitro zygot i prazarodków we wczesnych etapach embriogenezy w izolowanych zalążkach Brassica napus L.* Zesz. Nauk. AR w Krakowie 318: 257–260.

OVERBEEK VAN J., CONKLIN M.E., BLAKESLEE A.F. 1941. *Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos*. Science 94: 350–351.

WOJCIECHOWSKI A., NOWAK K., OLEJNICZAK J. 1997. *Kultury in vitro izolowanych zarodków Brassica napus i zalążków z krzyżowań oddalonych w rodzaju Brassica*. Zesz. Nauk. AR w Krakowie 318: 261–264.

WOJCIECHOWSKI A. 1998. *Zdolności regeneracyjne wybranych genotypów Brassica w kulturach in vitro*. Roczn. AR w Poznaniu. Rozprawy naukowe 289: 39–47.

WHITE P.R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. The Ronald Press, New York.

WOJCIECHOWSKI A. 1985. *Interspecific hybrids between Brassica campestris (L.) and B. oleracea (L.)*. I. Effectiveness of crossing, pollen tube growth, embryogenesis. Gen. Pol. 26: 423–436.

WOJCIECHOWSKI A., MAŚLANKIEWICZ J., YOUPING CHEN, KWAPISZEWSKA M. SPRINGER B. 2001. *Kultury in vitro izolowanych zarodków i zalążków z krzyżowań oddalonych w rodzaju Brassica*. Biotechnologia 2(53): 86–89.

Słowa kluczowe: Brassica, krzyżowanie oddalone, kultury in vitro

Streszczenie

Krzyżowanie międzygatunkowe i międzyrodzajowe jest ważnym narzędziem w zwiększaniu zmienności roślin uprawnych.

W Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu krzyżowania oddalone w rodzaju *Brassica* prowadzone są już od dłuższego okresu czasu [WOJCIECHOWSKI 1985]. Niska efektywność wiązania nasion w większości krzyżowań oddalonych skłoniła autorów niniejszej pracy do zastosowania kultur *in vitro* izolowanych załączków i zarodków dla pokonania barier post-zygotycznych uniemożliwiających otrzymanie roślin mieszańcowych.

W pracy wykonano krzyżowania zwrotne między: *B. napus*, *B. fruticulosa* oraz *B. campestris* ssp. *sarson*. Formy wybrane do krzyżowań posiadały ważne użytkowo cechy takie jak: żółta okrywa nasienna, samopylność lub samoniezgodność, odporność na choroby grzybowe i szkodniki.

W celu uniknięcia barier prezygotycznych w krzyżowaniach oddalonych zastosowano kilka wariantów zapylania roślin matecznych. Kultury *in vitro* zarodków i załączków zastosowano w celu zwiększenia efektywności krzyżowań oddalonych.

Spśród 6 wykonanych kombinacji krzyżowań, w kulturach *in vitro* izolowanych zarodków rośliny otrzymano z następujących krzyżowań: *B. napus* × *B. fruticulosa*, *B. fruticulosa* × *B. napus*, *B. napus* × *B. campestris*, *B. campestris* × *B. napus*.

W kulturach załączkowych otrzymano zregenerowane rośliny z krzyżowań zwrotnych *B. napus* i *B. campestris*. Nie otrzymano ani jednej rośliny z krzyżowań zwrotnych *B. campestris* i *B. fruticulosa*.

Ogółem przy zastosowaniu kultur *in vitro* załączków i zarodków otrzymano 58 zregenerowanych roślin. Efektywność kultur *in vitro* zależała głównie od genotypów użytych do krzyżowań.

APPLICATION OF *in vitro* EMBRYO AND OVULE CULTURES TO OVERCOME POST ZYGOTIC BARRIERS OF WIDE HYBRIDIZATION IN *Brassica* GENUS

Błażej Springer, Andrzej Wojciechowski, Małgorzata Pieškiewicz
Department of Genetics and Plant Breeding,
Agricultural University, Poznań

Key words: *Brassica*, wide hybridization, *in vitro* culture

Summary

Wide hybridization is an important tool in the introduction of important traits into cultivated plants. Interspecific crosses within *Brassica* species has been carried out in the Department of Genetics and Plant Breeding, Poznan University of Agriculture since 1985. Low efficiency of seeds setting makes the main problem of wide hybridization in most species.

In the presented study several reciprocal crosses among *Brassica napus*, *B. campestris* and *B. fruticulosa* were done, aiming to obtain new starting material

for oilseed rape breeding programmes. The species chosen for crossings were characterized by important and useful traits such as: yellow seed coat, selffertility, selfincompatibility, resistance to fungi and insects etc.

To avoid prezygotic barriers of incompatibility several variants of pollination were applied. *In vitro* culture of isolated embryos and ovules were used in order to increase the crossing efficiency.

As a result of embryo cultures, plants from 4 crosses' combination were obtained. These were: *B. napus* × *B. fruticulosa*, *B. fruticulosa* × *B. napus*, *B. napus* × *B. campestris*, *B. campestris* × *B. napus*. Ovule culture succeeded in reciprocal crosses of *B. napus* and *B. campestris* only. No plant was obtained from reciprocal crosses of *B. campestris* with *B. fruticulosa* nor embryo and ovule culture.

Application of *in vitro* techniques enabled to obtain in total 58 hybrid plants. Effectiveness of *in vitro* culture depended mostly on the genotype used in particular crosses.

Mgr inż. Błażej Springer
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego
ul. Wojska Polskiego 71C
60-625 POZNAŃ
e-mail: spring@au.poznan.pl