

Janetta Niemann, Andrzej Wojciechowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Efektywność zapyleń pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma u roślin z rodzaju *Brassica*

The effectiveness of fertilization with gamma irradiated pollen in plants of *Brassica* genus

Słowa kluczowe: rzepak, promieniowanie gamma, kultury in vitro, łagiewki pyłkowe

W prezentowanej pracy oceniano efektywność zapyleń pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma. Materiał roślinny użyty do badań stanowiły 4 genotypy rzepaku jarego (*Brassica napus*) oraz gorczyca etiopska (*B. carinata*). Pyłek wymienionych wyżej gatunków napromieniowano promieniami gamma w dawkach: 25, 50, 100, 200, 400 i 800 Gy. Kontrolę stanowił pyłek nietraktowany promieniowaniem. Zapylenie wykonano w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Na utrwalonym materiale roślinnym przeprowadzono obserwacje dotyczące kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka. Stwierdzono stymulujący wpływ promieniowania gamma w dawce 25 Gy na proces wnikania łagiewek pyłkowych do zalążków u wszystkich testowanych genotypów. Efektywność wykonanych zapyleń oceniono w oparciu o liczbę uzyskanych zarodków i zregenerowanych roślin, przy czym największą liczbę zarodków spośród analizowanych kombinacji uzyskano u odmian rzepaku jarego Topas i White Flower.

Key word: rapeseed, gamma radiation, pollen tubes, in vitro culture

The effectiveness of pollination with irradiated pollen was evaluated in this work. The plant material used in this experiment consisted of 4 *B. napus* genotypes and *B. carinata*. The pollination with pollen treated with gamma rays in doses 25, 50, 100, 200, 400 and 800 Gy and control pollen was performed in the glasshouse which belongs to the Department of Genetic and Plant Breeding, University of Life Sciences in Poznań. The observations of pollen grains germination and pollen tube growth were done on the fixed material. Stimulating influence of gamma rays at 25 Gy dose on pollen tubes entering into the ovules in all tested genotypes was observed. The effectiveness of pollination was evaluated by counting the number of obtained embryos and regenerated plants. The biggest number of embryos was obtained in two summer rapeseed cultivars Topas and White Flower.

Wstęp

Wykorzystanie promieniowania dla indukowania zmienności genetycznej jest dobrze poznaną metodą, przyczyniającą się do poprawienia wielu cech u licznych gatunków roślin. Szczególnie efektywne w tym względzie okazało się wykorzysta-

tane w niniejszej pracy promieniowanie gamma (Maluszynski i in. 1995). Nowoczesne metody hodowli roślin wykorzystują wiele technik związanych z zastosowaniem promieniowania jonizującego. Jedną z nich jest indukowana mutageneza, w której dzięki napromieniowywaniu pojedynczych komórek lub organów roślinnych (tj. ziarna pyłku, nasiona, siewki) otrzymuje się formy zmienione, w których poprawieniu ulegają pojedyncze cechy lub właściwości rośliny. Niekiedy zastosowanie promieniowania jest pomocne w celu pokonywania barier w krzyżowaniach międzygatunkowych. W takich przypadkach sztuczna stymulacja polegająca na zapyleniu znamienia osłabionym przez promieniowanie pyłkiem własnego lub obcego gatunku może inicjować rozwój partenogenetycznych zarodków i później nasion (Cuny i in. 1993, Gursoz i in. 1991, Sari i in. 1994, Santon i Dumas de Vaulx 1997, Caglar i Abak 1995, Kurtar i in. 2002). W przypadku, gdy rozwój zarodka inicjowany jest z komórki jajowej otrzymuje się rośliny haploidalne. Zjawisko naturalnej partenogenezy z zastosowaniem kultur izolowanych zarodków daje możliwość zastąpienia najczęściej stosowanych, choć kosztownych metod, tj. in vitro kultur pylnikowych i izolowanych mikrospor. Stąd też w prezentowanej pracy podjęto badania mające na celu określenie wpływu zapylenia napromieniowanym pyłkiem na wzrost łagiewek pyłkowych i rozwój zarodków, które mogą powstać z pobudzonej do rozwoju (przy użyciu pyłku osłabionego promieniowaniem gamma), niezapłodnionej komórki jajowej.

Material i metody

Material roślinny użyty do badań stanowiły wybrane 4 genotypy rzepaku jarego *B. napus* f. *annua* odmiany Topas, White Flower, mieszaniec F_3 (White Flower \times Topas), ród MAH 1701 oraz gorczyca etiopska *B. carinata*. Na materiale tym wykonano obserwacje dotyczące kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych oraz rozwoju zarodków w warunkach in vitro. Kontrolowane zapylenie wyżej wymienionych genotypów pyłkiem pochodzącym z badanych gatunków, traktowanym promieniami gamma w dawkach: 25, 50, 100, 200, 400 i 800 Gy oraz pyłkiem kontrolnym wykonano w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W niniejszej pracy wykonano 1190 zapyleń w obrębie 35 kombinacji — (dawka promieniowania \times genotyp). Z części wykonanych zapyleń, po różnym czasie od momentu naniesienia pyłku na znamię, zostały pobrane słupki dla oceny zgodności kojarzeniowej na podstawie obserwacji kiełkowania łagiewek pyłkowych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Pozostały material z wykonanych zapyleń posłużył do izolacji zarodków i oceny wpływu napromieniowanego pyłku na rozwój zarodka. Pyłek umiejscawiano na znamionach 24 h po wykonanej kastracji w stadium wyrosniętego pąka kwiatowego. Słupki do obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych

pobierano po 6, 12, 24 i 48 godzinach od momentu zapylenia. Utrwalano je w utrwalczu Carnoy'a (6 : 3 : 1 — EOH 95% : chloroform : kwas octowy 100%). Preparaty rozmazowe do analiz mikroskopowych wykonano zgodnie z metodą podaną przez Martina (1959). W każdej kombinacji zapylenia (genotyp × dawka promieniowania + kontrola × czas utrwalania od momentu zapylenia) analizowano po 6 słupków. Ogółem wykonano 840 preparatów rozmazowych do obserwacji przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Stopień penetracji słupka przez łagiewki pyłkowe określono oddzielnie dla znamienia, szyjki i załąźni w skali 6-stopniowej (Mackiewicz i inni 1979), gdzie:

- 0 — oznacza brak łagiewek,
- 1–4 — pośrednie ilości łagiewek,
- 5 — największe ilości łagiewek.

Wnikanie łagiewek do załążków określono liczbowo.

Ze 163 łuszczyn, które zawiązały się na 350 kwiatach, pozostawionych po uprzednio wykonanych zapyleniach, izolowano wszystkie obecne w załążkach zarodki w celu ich dalszej hodowli w warunkach *in vitro*. Zarodki izolowano po 19–25 dniach od momentu zapylenia. Wyizolowane z załążków zarodki umieszczano w zależności od stadium rozwojowego na pożywce W (White 1963) — stadium sercowate i wczesnej torpedy lub MS (Murashige, Skoog 1962) — stadium torpedy, późnej torpedy i prawie dojrzały. Hodowla zarodków w płytkach Petriego prowadzona była w pokoju hodowlanym, w temperaturze 26/22°C (dzień/noc) i 16-godzinnym fotoperiodzie o natężeniu światła 3800 luxów. W jednej płytce Petriego o średnicy 5 cm umieszczono na pożywkach 1–5 zarodków. Młodsze zarodki po 7 dniach hodowli na pożywce W przenoszono na pożywkę MS, na której inkubowano je przez kolejne 3–4 tygodnie, aż do uformowania się struktur roślinopodobnych. Struktury te przenoszono następnie na pożywkę MS_k (Keller, Armstrong 1977). W wielu przypadkach wykonywano kilka pasaży (2–7) na pożywce MS_k zanim otrzymano prawidłowo ukształtowane rośliny. Rośliny z prawidłowo uformowanymi pędami na pożywce MS_k przenoszono na pożywkę H₃ (Nitsh i in. 1969) w celu ich ukorzenienia. Ukorzenione rośliny przesadzono do doniczek, które przez pierwszych siedem dni trzymano w pokoju hodowlanym, a następnie hodowano w warunkach szklarniowych. Schemat prowadzenia kultur *in vitro* izolowanych zarodków przedstawiono w tabeli 1. Efektywność wykonanych zapyleń oceniono w oparciu o liczbę uzyskanych zarodków i zregenerowanych roślin.

Tabela 1

Schemat prowadzenia kultur in vitro izolowanych zarodków *Brassica*
Pattern of Brassica embryos cultures in in vitro conditions

Pożywki <i>Media</i>	Stadium rozwojowe zarodka i kolejne stadia hodowli <i>Embryo developmental stages and successive breeding stages</i>	Czas trwania hodowli <i>Time of in vitro culture</i>	Warunki hodowli <i>Conditions of in vitro culture</i>
White (W)	H*, ET	7 dni — <i>days</i>	pokój hodowlany <i>culture room</i>
Murashige i Skoog (MS)	T, LT, NM	3–4 tygodnie <i>3–4 weeks</i>	
Murashige i Skoog w modyfikacji Kellera (MS _k)	eksplantaty wytwarzające kalus i pierwsze liście <i>explants forming callus and first leaves</i>	5–11 tygodni <i>5–11 weeks</i>	
Nitsh'a i Nitsh (H ₃)	siewki z dobrze wykształconymi liśćmi <i>seedlings with well developed leaves</i>	2–3 tygodnie <i>2–3 weeks</i>	
Gleba/soil	ukorzone rośliny z aktywnym stożkiem wzrostu — <i>rooted plants with active growth apex</i>	do stadium dojrzałości <i>till ripened stage</i>	szklarnia <i>glasshouse</i>

* H — sercowate — *heart*, ET — wczesna torpeda — *early torpedo*, T — torpeda — *torpedo stage*
 LT — późna torpeda — *late torpedo*, NM — prawie dojrzały zarodek — *nearly matured*

Wyniki

Obserwacje kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych po traktowaniu promieniami gamma

Generalnie nie zaobserwowano osłabienia tempa wzrostu łagiewek pochodzących z pyłku traktowanego promieniowaniem gamma w porównaniu z pyłkiem kontrolnym. U odmian White Flower i Topas oraz u *B. carinata* pyłek na znamieniu kiełkował najwcześniej, bo już po 6 h od momentu zapylenia zarówno w kontroli, jak i we wszystkich kombinacjach traktowania. U rodu MAH 1701 po 24 h po zapyleniu pyłkiem wszystkich dawek traktowań obserwowano łagiewki w szyjce słupka, pomimo że po 6 h nie obserwowano ich na znamieniu. W tym samym czasie u odmian White Flower i Topas oraz u mieszańca F₃ łagiewki były już w zalążni. Najwięcej łagiewek w zalążni było po 48 h od zapylenia pyłkiem traktowanym promieniami gamma w dawce 25 Gy u odmiany White Flower, a dawkami 25 i 50 Gy u odmiany Topas i mieszańca F₃.

Wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążków przebiegało z różną intensywnością w zależności od dawki promieniowania oraz obserwowanego genotypu. Najintensywniejsze wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążków obserwowano u odmiany Topas po 24 i 48 godzinach od momentu zapylenia, pyłkiem traktowanym 25 i 50 Gy, a u odmiany White Flower po 48 h od momentu zapylenia pyłkiem kontrolnym oraz napromieniowanym dawką 25 Gy. Najwcześniej, bo już po 12 h od zapylenia, z nieco mniejszą intensywnością łagiewki wnikały do zalążków w większości kombinacji, z wyjątkiem 800 Gy u rodu MAH 1701, u którego najwięcej łagiewek do zalążków wnikało po 24 h od czasu zapylenia po traktowaniu pyłku promieniami w dawkach 25 i 100 Gy. Równie szybko po 12 h łagiewki wnikały do zalążków u mieszańca F₃ we wszystkich kombinacjach traktowania — a najwięcej po zastosowaniu dawek 50 i 100 Gy oraz w kontroli. Natomiast u *B. carinata* wnikanie łagiewek do zalążków obserwowano po 24 i 48 h od momentu zapylenia, głównie pyłkiem napromieniowanym dawkami 25 i 400 Gy oraz tylko po 24 h od zapylenia dla traktowania dawką 200 Gy.

W przypadku odmiany Topas oraz rodu MAH 1701 zaobserwowano stymulujący wpływ dawek 25 i 50 Gy na proces kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu i w dalszych częściach słupek. Te same dawki (25 i 50 Gy) stymulowały wnikanie łagiewek do zalążków u mieszańca F₃. Natomiast u odmiany White Flower, podobnie jak i u *B. carinata*, zauważono nieznacznie stymulujące działanie dawki 25 Gy na proces wnikania łagiewek.

Pomimo, że nie obserwowano żadnych zaburzeń w procesie kiełkowania łagiewek pyłkowych mogących być skutkiem zastosowania promieniowania, to jednak w sporadycznych przypadkach u rzepaku jarego odmiany White Flower zauważono wnikanie 2 łagiewek do jednego zalążka w kombinacjach zapyleń pyłkiem traktowanym promieniami gamma.

Kultury zarodków

W pracy wykonano 350 zapyleń: po 10 w każdej z 35 kombinacji (dawka promieniowania + kontrola × genotyp). Z 350 zapylnych kwiatów otrzymano 163 łuszczyzny, z których wyizolowano i umieszczono na pożywkach 936 zarodków. Najwięcej zarodków wyłożono w stadium torpedy (T) — 461, a najmniej w stadium sercowatym (H) — 170. Pozostałe zarodki izolowano w stadium późnej torpedy (LT) — 305 (tab. 2). Największa liczba wyizolowanych zarodków spośród kombinacji traktowanych promieniowaniem gamma pochodziła z odmiany rzepaku jarego Topas (64), po zapyleniu pyłkiem traktowanym dawką 100 Gy. W tej kombinacji z 10 zapylnych kwiatów otrzymano 7 łuszczyzn. Łuszczyzny te zawierały średnio 9,1 zarodków. Dużą liczbę zarodków otrzymano również u rzepaku jarego White Flower po traktowaniu pyłku promieniowaniem w dawce 25 Gy. Z 5 łuszczyzn wyizolowano łącznie 61 zarodków, przy czym najwięcej w stadium sercowatym (H) — (37). W przypadku *B. carinata* zarodki znajdowano jedynie w kombinacjach po zapyleniu pyłkiem traktowanym dawkami 25 i 400 Gy.

Tabela 2

Liczba zarodków umieszczonych na pożywce W lub MS w poszczególnych stadiach w momencie izolacji oraz liczba pasaży na pożywce MS_k — *Number of embryos placed on W or MS medium in different developmental stages at isolation time and number of passages on MS_k medium*

Genotyp <i>Genotype</i>	Dawka promieniowania [Gy] <i>Gamma radiation dose</i>	Liczba łuszczyń <i>No. of siliqua</i>	Liczba izolowanych zarodków <i>No. of isolated embryos</i>				Rodzaj pożywki <i>Medium type</i>		Liczba pasaży na pożywce MS _k <i>Passage number on MS_k medium</i>
			łącznie <i>general</i>	stadia rozwojowe <i>developmental stages</i>			W	MS	
				H	T	LT			
<i>B. napus var. oleifera f. annua</i> — rzepak jary									
Odmiana <i>Variety</i> Topas	0	8	75	14	35	26	+	+	4
	25	5	34	0	2	32		+	6–7
	50	6	43	0	26	17		+	5
	100	7	64	0	17	47		+	4
	200	6	51	0	41	10		+	5
	400	4	19	0	19	0		+	3
	800	5	12	5	7	0	+	+	3
Odmiana <i>Variety</i> White Flower	0	7	57	0	0	57		+	3
	25	5	61	37	17	7	+	+	6
	50	3	18	8	10	0	+	+	4
	100	4	53	20	33	0	+	+	4
	200	7	55	13	31	11	+	+	4
	400	4	37	26	11	0	+	+	4
	800	5	11	5	6	0	+	+	4
Ród <i>Strain</i> MAH 1701	0	0	0	0	0	0			0
	25	9	52	0	46	6		+	3
	50	7	16	4	12	0	+	+	3
	100	5	29	0	29	0		+	4
	200	4	28	6	22	0	+	+	3
	400	3	21	11	10	0	+	+	3
	800	0	0	0	0	0			0
Mieszaniec <i>Hybrid</i> F ₃	0	6	46	0	8	38		+	3
	25	5	21	13	5	3	+	+	3
	50	4	9	0	2	7		+	4
	100	5	40	0	10	30		+	4
	200	6	27	1	26	0	+	+	3
	400	6	6	1	5	0	+	+	4
	800	8	16	2	11	3	+	+	4

ciąg dalszy tabeli 2

Genotyp <i>Genotype</i>	Dawka promieniowania [Gy] <i>Gamma radiation dose</i>	Liczba łuszczyzn <i>No. of siliqua</i>	Liczba izolowanych zarodków <i>No. of isolated embryos</i>				Rodzaj pożywki <i>Medium type</i>		Liczba pasaży na pożywce MS _k <i>Pasagge number on MS_k medium</i>
			łącznie <i>general</i>	stadia rozwojowe <i>developmental stages</i>			W	MS	
				H	T	LT			
<i>Brassica carinata</i> — gorczyca etiopska									
	0	6	11	1	6	4	+	+	4
	25	7	21	1	13	7	+	+	4
	50	0	0	0	0	0			0
	100	0	0	0	0	0			0
	200	0	0	0	0	0			0
	400	4	3	2	1	0	+	+	2
	800	2	0	0	0	0			0
Łącznie		163	936	170	461	305	-	-	-

Efektywność hodowli zarodków była największa i znacznie przewyższała kontrolę u rzepaku jarego odmiany White Flower, traktowanego promieniowaniem w dawce 25 Gy. Ogółem w tej kombinacji wyizolowano 61 zarodków, z których otrzymano 119 roślin na pożywce H₃, co stanowiło 195% roślin w stosunku do liczby wyłożonych zarodków. Niestety nie wszystkie rośliny przeżyły po przeniesieniu do gleby i tylko 80 spośród 119 rozwinęło się w prawidłowe rośliny (131,1%). Mimo wszystko była to największa liczba roślin, jakie uzyskano w glebie spośród wszystkich testowanych kombinacji. W wielu kombinacjach krzyżowania, mimo iż wyizolowano znaczną liczbę zarodków, to nie udało się uzyskać podobnie wysokiej liczby ukorzenionych na pożywce H₃ roślin (tab. 3). Przykładem tego jest odmiana rzepaku jarego Topas traktowana promieniowaniem gamma w dawkach: 100, 200 i 400 Gy.

Uzyskanie roślin ukorzenionych na pożywce H₃ nie zawsze z kolei gwarantowało otrzymanie prawidłowo rozwijających się roślin w glebie. Efektywność hodowli zarodków, szacowana procentowym stosunkiem liczby ukorzenionych i prawidłowo rozwiniętych roślin w glebie do liczby wyłożonych zarodków, kształtowała się różnie u poszczególnych genotypów przy tych samych dawkach traktowania pyłku. Generalnie jednak u wszystkich genotypów rzepaku najwyższy procent roślin ukorzenionych w glebie obserwowano po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma, a nie pyłkiem kontrolnym (choć u poszczególnych genotypów przy różnych dawkach) (tab. 3). Najmniej ukorzenionych roślin w glebie otrzymano u *B. carinata* i to tylko w kombinacji kontrolnej oraz z większym efektem w kombinacji po zapyleniu pyłkiem traktowanym 25 Gy.

Tabela 3

Efektywność hodowli zarodków różnych genotypów *Brassica* w warunkach *in vitro*
The effectiveness of embryo culture of different Brassica genotypes in in vitro conditions

Genotyp <i>Genotype</i>	Dawka promieniowania [Gy] <i>Gamma radiation dose</i>	Liczba wyłożonych zarodków <i>No. of isolated embryos</i>	Liczba ukorzenionych roślin na pożywce H ₃ <i>No. of rooted plants on H₃ medium</i>	% roślin ukorzenionych do liczby wyłożonych zarodków <i>% of rooted plants to no. of isolated embryos</i>	Liczba roślin prawidłowo rozwiniętych w glebie <i>No. of well developed plants in soil</i>	% roślin w glebie do liczby wyłożonych zarodków <i>% of plants in soil/ no. of isolated embryos</i>
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> — rzepak jary						
Odmiana <i>Variety</i> Topas	0	75	47	62,6	41	54,6
	25	34	23	67,6	4	11,7
	50	43	16	37,2	5	11,6
	100	64	19	29,6	15	23,4
	200	51	8	15,6	6	11,7
	400	19	6	31,5	6	31,5
800	12	8	66,6	66,6	8	66,6
Odmiana <i>Variety</i> White Flower	0	57	93	163,1	22	38,5
	25	61	119	195,0	80	131,1
	50	18	21	116,6	20	111,1
	100	53	35	66,0	29	54,7
	200	55	20	36,3	18	32,7
	400	37	33	89,1	10	27,0
800	11	14	127,2	127,2	14	127,2
Ród <i>Strain</i> MAH 1701	0	0	0	0	0	0
	25	52	16	30,7	11	21,1
	50	16	11	68,7	2	12,5
	100	29	8	27,5	8	27,5
	200	28	4	14,2	4	14,2
	400	21	7	33,3	2	9,5
800	0	0	0	0	0	0

Ciąg dalszy tabeli 3

Genotyp <i>Genotype</i>	Dawka promieniowania [Gy] <i>Gamma radiation dose</i>	Liczba wyłożonych zarodków <i>No. of isolated embryos</i>	Liczba ukorzenionych roślin na pożywce H ₃ <i>No. of rooted plants on H₃ medium</i>	% roślin ukorzenionych do liczby wyłożonych zarodków <i>% of rooted plants to no. of isolated embryos</i>	Liczba roślin prawidłowo rozwiniętych w glebie <i>No. of well developed plants in soil</i>	% roślin w glebie do liczby wyłożonych zarodków <i>% of plants in soil/ no. of isolated embryos</i>
Mieszaniec <i>Hybrid F₃</i>	0	46	10	21,7	5	10,8
	25	21	2	9,5	2	9,5
	50	9	6	66,6	3	33,3
	100	40	11	27,5	6	15,0
	200	27	3	11,1	1	3,7
	400	6	4	66,6	4	66,6
	800	16	7	43,7	7	43,7
<i>B. carinata</i> — gorczyca etiopska						
	0	11	9	81,8	3	27,2
	25	21	16	76,1	11	52,3
	50	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
	200	0	0	0	0	0
	400	3	0	0	0	0
	800	0	0	0	0	0

Dyskusja

W prezentowanej pracy w celu oceny efektywności zapylenia roślin pyłkiem osłabionym promieniowaniem gamma w dawkach 25, 50, 100, 200, 400 i 800 Gy obserwowano intensywność kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych w poszczególnych częściach słupek. Generalnie nie zaobserwowano osłabienia tempa wzrostu łagiewek pochodzących z pyłku traktowanego promieniowaniem gamma w porównaniu z pyłkiem kontrolnym. Zauważono jednak różnice genotypowe w tempie kiełkowania łagiewek, u jednych genotypów obserwowano kiełkowanie ziaren pyłku już po 6 godzinach, a u innych po 12 godzinach od zapylenia. Wyjątek stanowiły mieszańce pokolenia (F_3), u których pyłek kiełkował na znamieniu dopiero po 24 h. U wszystkich genotypów zauważono nieznacznie stymulujący wpływ dawki 25 Gy na wzrost łagiewek pyłkowych i w tym przypadku obserwowano ich wnikanie do zalążków już po 12 h. Podobne obserwacje poczynili autorzy pracy dotyczącej melona (Cuny i in. 1993). Autorzy ci w celu indukcji gynogenetycznych zarodków u melona (*Cucumis melo*) zastosowali zapylenie pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma w dawkach 0,15; 0,5; 1,6; 2,5; 3,6 i 4 kGy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że generalnie odpowiedź pyłku na traktowanie promieniowaniem różniła się znacznie i była zależna od genotypu rośliny i zastosowanej dawki. Traktowanie pyłku promieniami gamma w dawce 0,5 kGy opóźniało nieco wzrost łagiewek pyłkowych. Niemniej jednak w tym przypadku wszystkie zalążki były zapłodnione 48 h od momentu zapylenia. W porównaniu do kontroli, obserwowano znaczną redukcję długości łagiewek pyłkowych. Redukcja w długości łagiewek pyłkowych była proporcjonalna do zastosowanych dawek promieniowania. Przy zastosowaniu wysokich dawek promieniowania gamma, długość łagiewek pyłkowych, a tym samym procent kiełkowania był znacznie zredukowany, a dla dawki 3,6 i 4 kGy – zerowy, czyli nie dochodziło tu do zapłodnienia. O możliwości uzyskiwania zarodków po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniowaniem donoszą również autorzy innych prac, jak np. zapylenie pyłkiem traktowanym promieniami gamma w dawkach 200 i 300 Gy u arbuza (Gürsöz i in. 1991, Sari i in. 1994), melona (Sauton i Dumas de Vault 1987, Sari i in. 1992, Cuny i in. 1992; Abak i in. 1996) i ogórka (Niemirówicz-Szczytt i Dumas de Vault 1989, Sauton 1989, Caglar i Abak 1995). W początkowych badaniach dotyczących melona dowiedziono, że dawka promieniowania gamma 0,3 kGy, indukowała rozwój roślin haploidalnych (2,5%). Niewiele gatunków roślin z powodzeniem tworzyło tak duże ilości partenogenetycznych haploidów. Przykładem może być kapusta biała i marchew, które wytworzyły tylko 2 zarodki haploidalne w przypadku zapylenia pyłkiem traktowanym uprzednio promieniami w dawkach odpowiednio 0,8–12 kGy i 0,3 kGy (Michalik 1996).

W niniejszej pracy po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma w dawkach 25, 50, 100, 200, 400 i 800 Gy również otrzymano zarodki. U analizowanych odmian rzepaku jarego i gorzycy etiopskiej zauważono jednak pewne preferencje genotypowe, co do dawki promieniowania gamma stymulującej rozwój zarodków. Przykładem może tu być ród rzepaku jarego MAH 1701, u którego nie otrzymano żadnych zarodków po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniami gamma w dawce 800 Gy. *Brassica carinata* okazała się jeszcze bardziej oporna na stymulację promieniami gamma i wytworzyła zarodki tylko po zapyleniu pyłkiem traktowanym dawką 25 i 400 Gy. Podobne spostrzeżenia poczynili Zhang i Lespinasse (1991), którzy u jabłoni zauważyli, że niektóre genotypy nie tworzyły żadnych zarodków przy zapyleniu pyłkiem napromieniowanym dawkami wyższymi niż 1 kGy, a dawki wyższe niż 0,125 kGy przyczyniały się do znacznego spadku liczby otrzymanych zarodków.

W świetle badań prowadzonych przez innych autorów u wielu gatunków roślin reakcja na promieniowania gamma była zależna od zastosowanej dawki. Według Kurtar i in. (2002) promieniowanie gamma w dawce 25 i 50 Gy zwiększało znacznie ilość otrzymanych zarodków gynogenetycznych u *Cucurbita pepo* L., przy czym napromieniowanie dawką 25 Gy dało większą ilość zarodków niż dawka 50 Gy. Po zapyleniu pyłkiem napromieniowanym większymi dawkami, tj. 100, 200, 300 i 400 Gy nie otrzymano żadnych zarodków u tego gatunku. Cuny i in. (1993) badali wpływ promieniowania gamma w dawkach 0,15; 0,5; 1,6; 2,5; 3,6 i 4 kGy na tworzenie haploidów na drodze partenogenezy u *Cucumis melo* L. Autorzy ci największą liczbę zarodków otrzymali po zapyleniu pyłkiem napromieniowanym dawką 0,5 kGy. Zapylenie pyłkiem napromieniowanym 3,6 i 4,0 kGy nie dało żadnych zarodków. Pozostałe dawki promieniowania nie modyfikowały produkcji haploidalnych zarodków, przy zastosowanych dawkach promieniowania gamma od 0,15 do 2,5 kGy wszystkie owoce zawierały taką samą liczbę zarodków.

Powyższy pogląd potwierdzają wyniki otrzymane w prezentowanej pracy. U odmiany Topas najwięcej zarodków otrzymano po zapyleniu dawką 100 Gy (64), zapylenie dawką 25 Gy zmniejszało liczbę zarodków (34), a zastosowanie dawki 800 Gy jeszcze bardziej zahamowało liczbę powstających zarodków (12 zarodków). Nie stanowi to jednak o efektywności prowadzonych kultur zarodkowych. W przypadku tej odmiany najwyższy procent ukorzenionych roślin w stosunku do liczby wyizolowanych zarodków otrzymano przy stosowaniu dawki 25 Gy, natomiast przy stosowaniu dawki 100 Gy mimo otrzymania wysokiej liczby zarodków efektywność kultur zarodkowych była najniższa (29,6%).

Kurtar i inni (2002) stwierdzili, że chociaż po zapyleniu pyłkiem traktowanym w dawkach 25–50 Gy powstawały zarodki u *Cucurbita pepo*, to jednak były one różnie uformowane i różnych kształtów w tym samym owocu. Procent roślin otrzymanych z zarodków u *Cucurbita pepo* zależał od typu i fazy rozwojowej zarodka. Ogólnie można powiedzieć, że procent otrzymanych roślin z zarodków zwiększał się wraz z zaawansowaniem fazy rozwojowej zarodków. Podobną zależność zauważono również prowadząc kultury zarodkowe w niniejszej pracy.

Wnioski

1. Przeprowadzone w prezentowanym eksperymencie warianty zapyleń wykazały, że traktowanie pyłku promieniowaniem gamma nie powodowało osłabienia tempa wzrostu łagiewek pyłkowych pochodzących z pyłku napromieniowanego w porównaniu z kontrolnym. Co więcej, zapylenie roślin pyłkiem napromieniowanym w dawce 25 Gy wykazało działanie stymulujące na proces wnikania łagiewek pyłkowych do zalążków u wszystkich testowanych genotypów.
2. Zapylenie roślin pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma w dawkach 25, 50, 100, 200, 400 i 800 Gy pozwoliło otrzymać zarodki w większości testowanych kombinacji. Zauważono jednak pewne preferencje genotypowe co do dawki promieniowania gamma stymulującej rozwój zarodków. Najwyższą efektywność hodowli zarodków (195%) zaobserwowano u odmiany rzepaku jarego White Flower po zapyleniu pyłkiem traktowanym promieniowaniem gamma w dawce 25 Gy.

Literatura

- Abak K., Sari N., Paksoy M., Yilmaz H., Aktas H., Tunali C. 1996. Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollens in melon, obtaining of dihaploid lines, determination of haploid plants by different techniques. Tr. J. Agric. Forest, 20 (5): 425-430.
- Caglar G., Abak K. 1995. Progress in the production of haploid embryos, plant and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen. Turkey. Acta Horticulturae, 492: 317-320.
- Cuny F., Dumas de Vaulx R., Longhi B., Siadous R. 1992. Analysis of muskmelon plants (*Cucumis melo* L.) obtained after pollination with gamma-irradiated pollen: Effect of different doses. Agronomie, 12: 623-630
- Cuny F., Grotte M., Dumas de Vaulx R., Rieu A. 1993. Effect of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L). Environmental and Experimental Botany, 33 (2): 301-312.
- Gürsöz N., Abak K., Pitrat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. 1991. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genet. Coop., 14: 109-110.
- Keller W.A., Armstrong K.C. 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther culture. Can. J. Bot., 55/10: 1383-1388.
- Kurtar E.S., Sari N., Abak K. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica, 127: 335-344.
- Mackiewicz T., Łuczkiwicz T., Wojciechowski A. 1979. Ocena stopnia samoniezgodności u poszczególnych odmian i rodów rzepaku ozimego. Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 23 (5): 283-291.
- Maluszynski M., Ahloowalia B.S., Sigurbjornsson B. 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. Euphytica, 85: 303-315.

- Martin F. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34: 125-128.
- Michalik B. 1996. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Drukrol, Kraków: 100-137.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Niemirowicz-Szczytt K., Dumas de Vaulx R. 1989. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genet. Coop.*, 12: 24-25.
- Nitsh J.P., Nitsh C., Hamon S. 1969. Production de *Nicotiana* diploids a partir de cals haploids cultives in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269: 1275-1278.
- Sari N., Abak K., Pitrat M., Dumas de Vaulx R. 1992. Induction of parthenogenetic haploid embryos and plant obtention in melon (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud ve *C. melo* L. var. *reticulatus* Naud). *Doga Tr J Agric Forest.*, 16: 302-314.
- Sari N., Abak K., Pitrat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. *Hortscience*, 29: 1189-1190.
- Sauton A., Dumas de Vaulx R. 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogénèse induite par du pollen irradié. *Agronomie*, 7: 141-148.
- Sauton A. 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genet. Coop.*, 12: 22-23.
- White P.R. 1963. Thee cultivation of animal plant cells. The Ronald Press, New York.
- Zhang Y.X., Lespinasse Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica*, 54: 101-109.