

Jan Krzymański

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu, Zakład Roślin Oleistych

Perspektywy badań nad rzepakiem i jego hodowlą

Prospects of research and breeding on oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Słowa kluczowe: rzepak, *Brassica napus* L., cele hodowli, materiały wyjściowe, krzyżowania oddalone, mutageneza, rośliny transgeniczne, haploidyzacja

Key words: oilseed rape, *Brassica napus* L., breeding goals, initial materials, interspecific crossing, mutagenesis, transgenic plants, haploidization

Zostały omówione pożądane kierunki ulepszania rzepaku, a następnie poszczególne elementy i etapy hodowli tej rośliny. Sprecyzowano najbardziej perspektywiczne cechy wymagające doskonalenia hodowlanego. Omówiono możliwe źródła genetyczne tych cech i różne sposoby otrzymywania materiałów wyjściowych do hodowli. Przedyskutowano metody oceny materiałów hodowlanych pod względem ulepszanej cechy. Pokazano jak sposób dziedziczenia i ekspresji tej cechy wpływa na wybór metody hodowlanej. Oceniono perspektywy zastąpienia metod rekombinacyjnych hodowlą nowych odmian mieszańcowych oraz wykorzystaniem metod biotechnologicznych.

Desired directions of oilseed rape improvement were described and then the elements and steps of breeding were discussed. The most perspective traits for breeding and the methods of search for genetic sources of these characters were shown. Search for sources of desired traits, selection of initial material for breeding, methods to estimate quality characters were discussed. It was shown how the manner of inheritance and expression of character influenced the choice of breeding method. Prospects of replacing recombination methods with breeding of new hybrid varieties and use of biotechnological method were evaluated.

Cele prac hodowlanych nad rzepakiem

Burzliwy rozwój prac badawczych nad rzepakiem w ostatnich trzydziestu latach doprowadził do ważnych osiągnięć hodowlanych i gwałtownego wzrostu produkcji tej rośliny. Sukcesy te zostały osiągnięte dzięki ścisłemu powiązaniu między hodowlą a pracami badawczymi. Odkrycie nowych źródeł genetycznych, poznanie sposobu dziedziczenia ważnych gospodarczo cech, praktyczne wykorzystanie osiągnięć genetyki cech ilościowych oraz najnowszych metod analizy instrumentalnej było podstawą tych osiągnięć. Jednak dotychczasowe prace nie wyczerpały wszystkich możliwości, a wręcz otwały nowe perspektywy dalszego postępu. Przyszłe kierunki prac będą wyznaczane, tak jak dotychczas,

przez potrzeby gospodarcze, a limitowane osiągnięciami i postępem prac badawczych.

Najbliższe zadania prac badawczych i hodowlanych to:

- lepsze dostosowanie jakości do potrzeb użytkowników produktów rzepakowych, w tym:
 - skład kwasów tłuszczowych potrzebny w różnych zastosowaniach,
 - wyższa jakość paszowa śruty lub wytloków;
- dalsze ulepszanie cech agronomicznych, takich jak:
 - wysokie i wierne plonowanie,
 - zimotrwałość,
 - niskie nakłady na produkcję,
 - odporność na choroby i szkodniki,
 - odporność na okresowe niedobory wody,
 - zmniejszenie skłonności do wylegania i osypywania,
 - zdolność do konkurencji z chwastami.

Do osiągnięcia tych cech przez nowe odmiany w ich hodowli trzeba będzie korzystać z niżej omówionych elementów prac hodowlanych.

Zróżnicowanie genetyczne materiałów wyjściowych

Źródła genetyczne pożądaných przez hodowcę cech mogą pochodzić z genotypów dostępnych w różnych populacjach. Zmienność genetyczna tych populacji może być różnej natury.

Naturalna zmienność wewnątrzgatunkowa

Naturalna zmienność genetyczna w obrębie gatunku *Brassica napus* L., a szczególnie wśród rzepaków ozimych, jest bardzo ograniczona. Rzepak ozimy jest gatunkiem stosunkowo młodym, gdyż z badań starych zielników wynika, że pojawił się w Zachodniej Europie około 500 lat temu, w odróżnieniu od rzepiku znanego od niepamiętnych czasów. Prawdopodobnie powstał na drodze spontanicznego przekrzyżowania się kapusty z rzepikiem. Na przykład francuska nazwa Colza pochodzi od holenderskiego Kool Zaaden, czyli nasiona kapusty i różni się wyraźnie od nazwy rzepiku — Navette.

Do poważnego ograniczenia zmienności genetycznej rzepaku ozimego doszło w pierwszej połowie dwudziestego wieku. Doprowadziło do tego szerokie wykorzystywanie w pracach hodowlanych czołowej odmiany rzepaku ozimego Lembke.

Rzepak jare, szczególnie pochodzenia środkowo europejskiego, cechują się znacznie większą zmiennością genetyczną, co wskazywałoby na ich wcześniejsze powstanie. Znaleziono u nich tak ważne gospodarczo cechy, jak niska zawartość

w nasionach glukozynolanów (szkodliwe z punktu widzenia wartości żywieniowej związku siarkowe) lub olej o niskiej, praktycznie zerowej zawartości kwasu erukowego.

Krzyżowania rzepaków ozimych z rzepakami jarymi, które były podstawą hodowli jakościowej prowadzonej od lat sześćdziesiątych, znacznie zwiększyły zmienność genetyczną materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian podwójnie ulepszonych. Odmiany te cechują się bezerukowym olejem i bardzo niską zawartością glukozynolanów w nasionach. W czasie prac hodowlanych doszło jednak do ponownego poważnego zmniejszenia zmienności genetycznej. Wszystkie nowe, podwójnie ulepszone odmiany zawierają te cechy jakościowe pochodzące tylko z dwu źródeł genetycznych, a mianowicie niską zawartość glukozynolanów z polskiej odmiany rzepaku jarego Bronowski i bezerukowy olej z kanadyjskiej linii wyprowadzonej z odmiany Liho. Rzepak jary Liho został wyselekcjonowany w Niemczech z materiałów zebranych w Polsce w czasie II wojny światowej.

Zmienność pokrewnych gatunków i rodzajów

Rzepak jest allotetraploidem powstałym ze skrzyżowania dwu diploidalnych gatunków: *Brassica oleracea* i *Brassica rapa*. Oba gatunki rodzicielskie posiadają dużą zmienność genetyczną, która może być wykorzystana do tworzenia zróżnicowanych genetycznie form gatunku *Brassica napus* na drodze resyntezy. Możliwe jest również wprowadzanie zmienności poprzez krzyżowania oddalone z gatunkami i rodzajami pokrewnymi, a następnie powrót do genomu rzepaku przez krzyżowania wsteczne.

Zmienność indukowana mutagenezą

Jeżeli brak jest zmienności naturalnej, lub jest ona niewystarczająca, można próbować indukować zmienność genetyczną na drodze indukcji mutacji.

Korzystne mutacje występują bardzo rzadko. Największą trudność w tej metodzie stanowi konieczność pracy z bardzo liczebnymi populacjami. Poszukiwanie zmian morfologicznych w takich populacjach i wykonanie dziesiątek tysięcy analiz chemicznych jest wyjątkowo pracochłonne.

Rośliny genetycznie modyfikowane (GMOs)

Rośliny transgeniczne rzepaku są otrzymywane przez wprowadzanie do ich genomu obcych genów, kodujących różnorodne cechy, a mogących pochodzić od bardzo odległych genetycznie dawców. Rośliny takie mogą mieć bardzo zmienione albo nie spotykane cechy jakościowe, przy czym zmianami tymi można kierować poprzez odpowiedni dobór wprowadzanego DNA.

Wykorzystanie metod genetycznych

Kultury in vitro

Znaczne przyspieszenie w utrwalaniu genotypów rzepaku (homozygotyzacja) można otrzymać przez wytworzenie linii z podwojonych haploidów. Najczęściej stosuje się w tym celu androgenezę metodą kultur mikrospor in vitro. Metoda ta została dobrze opanowana dla rzepaku, a dzięki bezpośredniej konwersji zarodków uzyskiwanych z mikrospor w siewki oraz traktowaniu kolchicyną mikrospor pozwala na uzyskiwanie dużej ilości podwojonych haploidów w stosunkowo krótkim czasie.

Krzyżowania oddalone

Obiecującą metodą są krzyżowania oddalone, o ile wśród spokrewnionych z rzepakiem gatunków występują poszukiwane cechy jakościowe. Przy krzyżowaniu generatywnym znaczną poprawę wydajności uzyskuje się poprzez stosowanie kultur zarodków mieszańcowych in vitro. Często dla przywrócenia płodności mieszańcom międzygatunkowym konieczna jest ich poliploidyzacja, a następnie krzyżowanie wypierające z rzepakiem.

Jeżeli silne bariery niezgodności nie pozwalają na uzyskanie mieszańców generatywnych można zastosować trudniejszą i bardziej skomplikowaną fuzję protoplastów, tak symetryczną jak i asymetryczną w której jeden gatunek jest dawcą protoplastów z żywotnymi jądrami a unieczynionym DNA cytoplazmatycznym, a drugi gatunek dostarcza protoplastów ze zniszczonymi jądrami.

Bardzo korzystną metodą uzyskiwania rzepaków syntetycznych z diploidalnych gatunków rodzicielskich jest następujące postępowanie. Wybrane formy rodzicielskie niosące pożądane cechy krzyżuje się wykorzystując kultury in vitro zarodków mieszańcowych. Uzyskane w ten sposób haploidalne rośliny zresyntetyzowanego rzepaku zapyla się pyłkiem wartościowej gospodarczo i pod względem jakościowym odmiany rzepaku. W kwiatach haploidalnego rzepaku występuje zazwyczaj niewielka ilość niezredukowanych komórek jajowych, co pozwala na otrzymanie nasion. Nasiona te stanowią diploidalne pokolenie mieszańcowe F_1 pomiędzy rzepakiem syntetycznym i odmianą.

Mutageneza

Mutacje rzepaku indukuje się działając na rośliny lub nasiona mutagenami chemicznymi albo promieniowaniem jonizującym. Ostatnio dzięki dobremu opanowaniu kultur mikrospor in vitro można do wywoływania mutacji stosować naświetlanie mikrospor promieniami ultrafioletowymi. Stadium rozwojowe rośliny,

dawkę mutagenu i czas jego działania należy dobrać w każdym przypadku indywidualnie. Stosowanie bardziej drastycznych warunków zwiększa częstość i głębokość mutacji, jednak uzyskane na tej drodze mutanty z powodu dużych zmian w aparacie genetycznym są mało żywotne i ich praktyczne wykorzystanie wymaga długoletnich prac hodowlanych.

Markery molekularne i mapowanie chromosomów

Początkowo jako markery molekularne stosowano markery białkowe, głównie izoenzymatyczne. Markery te na ogół łączą się bezpośrednio z badaną cechą, ale ekspresja genów warunkujących syntezę tych białek zależy od części rośliny lub nawet tkanki i na ogół występuje w określonych stadiach rozwojowych rośliny.

Obecnie coraz większego znaczenia nabiera stosowanie metod opartych na markerach DNA. Dla hodowcy niezmiernie ważnym jest to, że metody oparte na analizach DNA pozwalają na bezpośrednie określanie genotypu z pominięciem zmienności niedziedzicznej oraz to, że można je stosować do dowolnej części rośliny, w dowolnym okresie jej rozwoju. **Znajomość genotypu rośliny jeszcze przed kwitnieniem pozwala na kierowane zapylenie zwiększające znacznie efektywność prac hodowlanych.**

Dawniej najczęściej stosowane były markery RFLP (restriction fragment length polymorphism — analiza długości fragmentów DNA po cięciu enzymami restrykcyjnymi). Obecnie uważa się, że bardziej przydatne w badaniach i pracach hodowlanych są markery oparte na metodach PCR (polymerase chain reaction — reakcja łańcuchowa polimerazy) np. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA — analiza długości odcinków DNA otrzymanych przez namnażanie DNA z zastosowaniem losowo dobranych starterów) lub bardziej powtarzalne SCAR (sequence characterised amplified region — sekwencja charakteryzująca amplifikowany region). Do ustalenia, które z markerów DNA są skorelowane z badaną cechą można użyć mapowania genetycznego chromosomów lub prościej analizy linii prawie izogenicznych różniących się przede wszystkim poszukiwaną cechą jakościową. Jeżeli jest znana sekwencja nukleotydów w genie warunkującym cechę jakościową najlepiej posłużyć się markerami genowymi oznaczanymi metodą SCAR.

Mapowanie cech ilościowych (analiza QTL — quantitative trait loci — loci cech ilościowych) ułatwia znalezienie markerów sprzężonych z cechami ilościowymi, co powinno przyczynić się do zwiększenia skuteczności selekcji na te cechy.

Otrzymywanie roślin transgenicznych

Ostatnio coraz większego znaczenia nabiera inżynieria genetyczna. Jeżeli potrafimy ustalić, które odcinki DNA są genami odpowiedzialnymi za poszukiwaną przez nas cechę jakościową i potrafimy je wyodrębnić, to po połączeniu ich

z odpowiednio dobranym promotorem i wektorem, możemy próbować transfekować nimi rośliny. Najczęściej jako wektory dla genów stosuje się plazmidy *Agrobacterium*, ale możliwa jest także bezwektorowa transfekcja roślin i komórek roślinnych. Czynnikiem promocyjnym może być glikol polietylenowy w środowisku alkalicznym, ale uzyskano także pozytywne rezultaty za pomocą elektroporacji lub metodą tak zwanej „armatki genowej”.

Metody hodowlane

Metody rekombinacyjne

Hodowla polega przeważnie na wprowadzeniu cechy jakościowej do wypróbowanych genotypów rzepaku o wysokiej wartości gospodarczej. Materiał wyjściowy krzyżuje się z czołowymi odmianami uprawnymi sprawdzonymi w praktyce i dobrze dostosowanymi do miejscowych warunków.

Zastosowana metoda krzyżowania zależy od wartości gospodarczej materiału wyjściowego niosącego pożądaną cechę jakościową. Jeżeli materiał wyjściowy posiada szereg cech ujemnych, to dla ich wyeliminowania konieczne jest wielokrotne krzyżowanie, np. metodą krzyżowań wstecznych wypierających. Gdy defekty materiału wyjściowego są niewielkie, można po przekrzyżowaniu zastosować selekcję metodą rodowodową. Znaczne przyspieszenie w utrwalaniu genotypów (homozygotyzacja) można otrzymać przez wytworzenie linii z podwojonych haploidów. Najczęściej stosuje się w tym celu androgenezę metodą kultur mikrospor *in vitro*.

W rozszczepiających się pokoleniach należy prowadzić selekcję na wartość gospodarczą i ulepszone cechy jakościowe w oparciu o analizy chemiczne lub markery. Uzyskane rody o ulepszonej jakości muszą przejść wszechstronną ocenę w cyklu doświadczeń polowych.

Metody kombinacyjne

Metody hodowli kombinacyjnej są wykorzystywane w tworzeniu odmian syntetycznych i odmian mieszańcowych. Ze względu na mały stopień obcopylności u rzepaku efekt heterozji w odmianach syntetycznych jest niezadawalający. Dlatego po opracowaniu metod produkcji mieszańców F_1 na skalę produkcyjną zaniechano prac nad odmianami syntetycznymi.

Do produkcji odmian mieszańcowych rzepaku można wykorzystywać genetyczną cytoplazmatyczno-genową męską sterylność albo samoniezgodność. Najlepiej opracowanym dotychczas systemem męskiej sterylności jest CMS Ogura — INRA. Jediną przeszkodą jest jak dotychczas brak restorerów płodności

o wystarczająco niskiej zawartości glukozytynolanów. Prace nad uzyskaniem takich restorerów są intensywnie prowadzone, a tymczasem wykorzystuje się tak zwane mieszańce złożone składające się z niezrestorowanego mieszańca F_1 oraz odmiany będącej źródłem pyłku.

Genetyka populacji

Większość ważnych gospodarczo cech rzepaku jest warunkowana poligenicznie. W ich ulepszaniu konieczne jest korzystanie z metod genetyki cech ilościowych. Aby móc z nich korzystać konieczne są badania nad odziedziczalnością tych cech i ich genetycznym uwarunkowaniem. Badania te najlepiej przeprowadzać poprzez krzyżowania w układzie diallelicznym lub czynnikowym.

Biometria

Ocena wartości gospodarczej jest prowadzona w doświadczeniach polowych. Tylko selekcja oparta na istotnych i statystycznie udowodnionych różnicach prowadzi do postępu hodowlanego. Dlatego konieczne jest korzystanie z bogatego dorobku doświadczalnictwa rolniczego. Dobór układu doświadczalnego musi uwzględniać stopień zróżnicowania genetycznego selekcyjowanej populacji, wpływu środowiska i możliwości technicznych. Należy pamiętać, że nie wystarczy aby dany układ można było opracować statystycznie metodą komputerową, dla skutecznego wyboru niezbędne jest uzyskanie udowodnionych różnic.

Ocena jakości

Dla selekcji rzepaku na określoną cechę jakościową niezbędna jest możliwość jej zmierzenia. Dotychczas znakomitą większość cech jakościowych oznacza się za pomocą analiz chemicznych wykonywanych na częściach użytkowych roślin. Badania genetyczne i prace hodowlane wymagają stosowania odpowiednio dobranych i dopracowanych metod analitycznych. Konieczne jest wykonywanie dużej ilości oznaczeń, a równocześnie należy ograniczyć do minimum ilość materiału roślinnego, który ulega zniszczeniu. Wymaganie to jest spełniane najczęściej przez metody fizykochemiczne, np. nieniszczący pomiar zawartości tłuszczu w nasionach za pomocą analizatora NMR. Często dalszy postęp prac hodowlanych jest warunkowany opracowaniem nowych metod analitycznych dostosowanych do wymagań selekcji roślin.

Bardzo obiecująco wygląda stosowanie metody analiz w bliskiej podczerwieni. Metoda ta jednak może służyć tylko do selekcji wstępnej, bowiem oparta jest na ustalonej empirycznie korelacji wielozmiennej selekcyjowanych cech z mierzonym widmem, natomiast w hodowli poszukuje się zazwyczaj osobników łamiących korelacje występujące w segregującej populacji.

Ocena odporności na stresy biotyczne i abiotyczne

Ocena ta ma zasadnicze znaczenie w hodowli odpornościowej na choroby i szkodniki oraz w ulepszaniu zimotrwałości i odporności na okresowe susze. Cechy te podlegają ocenie w doświadczeniach polowych, jednak z powodu niemożliwości kontrolowania warunków środowiska, dopiero średnie z kilku lat i miejscowości pozwalają na ich w miarę obiektywną ocenę. Dlatego ważne znaczenie mają prace nad opracowaniem metod testowania ich w kontrolowanych warunkach.

Wnioski

1. W ostatnich trzydziestu latach zrobiono olbrzymi postęp w udoskonalaniu rzepaku, jednak nie wyczerpuje to możliwości i potrzeb dalszego rozwoju w tej dziedzinie.
2. Uzyskany postęp był możliwy dzięki kompleksowemu wykorzystaniu wyników badań genetycznych oraz zastosowaniu nowoczesnych metod hodowli, a także dzięki ścisłemu powiązaniu prac hodowlanych z pracami badawczymi.
3. Rzepak stał się rośliną modelową, tak co do wykorzystywania nowych metod hodowlanych, jak i w wykorzystywaniu osiągnięć biologii molekularnej.
4. W produkcji rzepaku dominują obecnie odmiany populacyjne, a uzyskiwane w tym zakresie wyniki hodowlane wskazują na dalsze możliwości postępu w tej dziedzinie.
5. Przyszłość należy prawdopodobnie do odmian mieszańcowych, o ile uda się wykorzystać maksymalnie heterozję stwierdzaną w pracach badawczych.
6. Jako najbliższe cele ulepszeń jakościowych należy wymienić odmiany żółtonasienne i o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych.