

Błażej Springer, Andrzej Wojciechowski

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

Ocena efektywności kultur *in vitro* izolowanych zarodków i zalążków w otrzymywaniu mieszańców oddalonych w rodzaju *Brassica*

The efficiency of obtaining interspecific hybrids in *Brassica* genera with applying *in vitro* culture of isolated embryos and ovules

Słowa kluczowe: *Brassica*, kultury *in vitro*, krzyżowanie oddalone

W prezentowanej pracy wykonano wzajemno-przemienne krzyżowania oddalone pomiędzy pięcioma gatunkami w rodzaju *Brassica*, tj.: *B. napus*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. campestris* ssp. *chinensis*, *B. campestris* ssp. *sarson*, *B. hirta* oraz *B. fruticulosa*. Ogółem wykonano 76 kombinacji krzyżowań stosując kontrolowane zapylenie na znamię i na szyjkę w miejscu odcięcia znamienia. Kultury izolowanych zalążków zastosowano w 72, a kultury izolowanych zarodków w 18 kombinacjach krzyżówkowych. Zalążki z łuszczyń izolowano po 7–14 dniach, a zarodki po 14–21 dniach od kontrolowanego zapylenia. Inkubację zalążków i zarodków prowadzono na pożywkach White'a, Moorashige i Skoog'a oraz Nitsh'a i Nitsh'a. Po zastosowaniu kultur zalążkowych zregenerowane rośliny mieszańcowe otrzymano z 22 kombinacji krzyżówkowych, a z kultur zarodkowych z 9 kombinacji krzyżówkowych. W siedmiu kombinacjach krzyżówkowych zregenerowane rośliny otrzymano zarówno w kulturach zalążkowych jak i zarodkowych.

Zalążkowe kultury *in vitro* okazały się przydatnym narzędziem w otrzymywaniu roślin z krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*, zwłaszcza w kombinacjach krzyżówkowych, w których występowało zamieranie zarodków we wczesnych fazach ich rozwoju.

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

In this paper reciprocal wide crosses between five *Brassica* species i.e. *B. napus*, *B. oleracea* var. *botrytis*, *B. campestris* ssp. *chinensis*, *B. campestris* ssp. *sarson*, *B. hirta* and *B. fruticulosa* were performed. Generally, 76 cross combinations have been done and control pollination on the stigma and on the style was applied after cutting of the stigma. The isolated ovule cultures were applied in 72 cross combinations and in 18 cross combinations the technique of embryo rescue culture was applied. The ovules from the silique were isolated from 7 to 14 days after pollination and embryo between 14–21 days. The isolated ovules and embryos were incubated on White, Moorashige & Skoog and Nitsh & Nitsh media. The hybrid plants were obtained from 22 cross combinations using ovule culture and from 9 combinations after applying embryo culture. In seven cross combinations, both embryo rescue and ovule culture were successful. The ovule cultures turned out to be a very helpful tool in obtaining plants from wide crosses of *Brassica* species.

Wstęp

Rodzina roślin krzyżowych (*Cruciferae*) pod względem ekonomicznym jest jedną z najważniejszych grup roślin uprawnych w skali świata, a rzepak (*B. napus* var. *oleifera*) jest podstawową rośliną oleistą w Polsce. Nasiona rzepaku są źródłem surowca dla przemysłu spożywczego, paszowego, chemicznego i petrochemicznego. W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na olej rzepakowy ze strony przemysłu rosną także wymagania stawiane hodowli rzepaku. Oprócz wysokiego plonowania, celem hodowców jest dostosowanie cech jakościowych nasion do rosnących wymogów rynku. Aktualne programy hodowlane rzepaku koncentrują się m.in. na modyfikacji składu kwasów tłuszczowych w oleju, wprowadzaniu cech odporności na szkodniki i choroby oraz otrzymywaniu form żółtonasiennych. Utrudnieniem w realizacji tak rozległych celów hodowlanych jest stosunkowo ograniczona zmienność genetyczna gatunku *B. napus*. Jednym ze sposobów zwiększenia zakresu tej zmienności, a zatem i możliwości ekspresji nowych, pożądaných cech jest krzyżowanie oddalone. Powszechnie występującym zjawiskiem, które utrudnia otrzymywanie roślin z krzyżowań oddalonych jest zamieranie zarodków mieszańcowych we wczesnych etapach rozwoju. Dlatego dla zwiększenia efektywności krzyżowania oddalonego współczesna hodowla wykorzystuje technikę kultur *in vitro* izolowanych zarodków i zalążków.

Celem pracy była ocena przydatności kultur zarodkowych i zalążkowych do regeneracji roślin z krzyżowań oddalonych wybranych gatunków z rodzaju *Brassica* przy zastosowaniu dwóch sposobów zapylenia: na znamię słupka oraz na szyjkę w miejscu odcięcia znamienia.

Material i metody

Materiał badawczy użyty w eksperymencie stanowiły dwie odmiany jare (White Flower, Stellar) i dwa genotypy ozime rzepaku (odmiana Leo, ród MAH 1690) ($2n = 4x = 38$), dwa podgatunki *B. campestris* ssp. *sarson* (żółtonasienny rzepik jary) i ssp. *chinensis* (kapusta chińska) ($2n = 2x = 20$) oraz *B. oleracea* var. *botrytis* (brokuł) ($2n = 2x = 18$), *B. hirta* (gorczyca biała) ($2n = 2x = 24$) i dwa ekotypy dzikiego gatunku *B. fruticulosa* ($2n = 2x = 16$). Formy mateczne do krzyżowań kastrowano w stadium wyrośniętego pąka i krzyżowano w układzie wzajemno-przemiennym. Na wcześniejszym etapie badań ustalono, że wykonanie zapylania na szyjkę słupka po uprzednim usunięciu znamienia rośliny matecznej powoduje lepsze wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążni w większości wykonanych kombinacji krzyżówkowych (Springer, Wojciechowski 2004). Z tego powodu w omawianym eksperymencie do kultur *in vitro* wykorzystano zalążki i zarodki otrzymane w wyniku dwóch wariantów zapyleń: A — na znamię słupka i B — na szyjkę

słupka po usunięciu znamienia. Zalążki z łuszczyn izolowano z 72 spośród 76 wykonanych krzyżowań po 7–14 dniach od zapylenia, a zarodki do kultur zarodkowych z 18 kombinacji krzyżówkowych po 14–21 dniach, co odpowiadało ich stadium rozwojowemu od późnosercowatego (late heart — LH) do późnej torpedy (late torpedo — LT).

Poszczególne etapy hodowli w kulturach *in vitro* w syntetycznym ujęciu przedstawiały się następująco:

Pożywka indukująca W (White 1963) lub MS (Murashige, Skoog 1962)



Pożywka różnicująca MS_k — MS w modyfikacji Kellera (Keller, Armstrong 1977)



Pożywka ukorzeniająca H₃ (Nitsh i in. 1969)

Efektywność prowadzonych kultur zarodkowych i zalążkowych wyrażono procentowym stosunkiem liczby zregenerowanych roślin do liczby izolowanych zarodków lub zalążków.

Wyniki i dyskusja

Krzyżowanie międzygatunkowe jest postrzegane przez hodowców roślin zarówno jako efektywna metoda kreowania nowych gatunków roślin uprawnych jak i introdukcji pożądanych genów z dzikich pokrewnych gatunków do gatunków uprawnych (Wojciechowski i in. 2006). Za początek prac mających na celu zwiększenie zmienności genetycznej na drodze krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica* można przyjąć rok 1924, kiedy to Karpechenko otrzymał międzyrodzajowego mieszańca pomiędzy *Raphanus sativus* i *B. oleracea*. Otrzymywanie mieszańców na drodze krzyżowań oddalonych jest utrudnione ze względu na zaburzenia w procesie zapylenia i zapłodnienia (tzw. bariery prezygotyczne) oraz na skutek zaburzeń w rozwoju zarodka lub bielma (tzw. bariery postzygotyczne).

Bieńkowska-Mochtak (1982) uważa, że zamieranie zarodków na wczesnym etapie rozwoju jest najczęstszą przyczyną uniemożliwiającą otrzymywanie mieszańców oddalonych.

W celu wyeliminowania barier postzygotycznych niezbędne jest zastosowanie zabiegów wspomagających rozwój niedojrzałych zarodków mieszańcowych. Najczęściej stosowaną techniką wspomagającą rozwój zarodków z krzyżowań oddalonych jest doprowadzenie do ich pełnego rozwoju na pożywce, w zalążkowych lub zarodkowych kulturach *in vitro* (Malepszy i in. 1989).

W prezentowanej pracy wykorzystano zalążkowe i zarodkowe kultury *in vitro* w celu ominięcia barier postzygotycznych w krzyżowaniach oddalonych w obrębie rodzaju *Brassica*.

Ogółem wykonano 76 kombinacji krzyżówkowych pomiędzy formami wyjściowymi. Poniżej opisano efektywność kultur *in vitro* tylko w tych kombinacjach krzyżówkowych, w których otrzymano zregenerowane rośliny. Po zastosowaniu kultur *in vitro* zregenerowane rośliny otrzymano w 24 kombinacjach krzyżówkowych. Z tego: 22 kombinacje z kultur zalążkowych i 9 kombinacji z kultur izolowanych zarodków. W siedmiu kombinacjach krzyżówkowych zregenerowane rośliny otrzymano zarówno w kulturach zalążkowych jak i zarodkowych. Przy prezentacji tych wyników należy jednak zwrócić uwagę, że kultury zalążkowe prowadzono w 72 spośród 76 wykonanych kombinacji krzyżówkowych, a kultury zarodkowe prowadzono tylko w 18 kombinacjach krzyżówkowych. Było tak dlatego, że w przeważającej większości wykonanych krzyżowań łuszczyzny zamierały przed upływem 14 dni od zapylenia. W tym terminie zarodki nie osiągały jeszcze stadium rozwojowego, które umożliwiałyby prowadzenie kultur zarodkowych i w tych przypadkach zastosowano kultury zalążkowe. Ponadto, do kultur *in vitro* nie pobierano zalążków z kombinacji krzyżówkowych, w których słupki zamierały przed upływem 7 dni od zapylenia.

Efektywność regeneracji określono jako stosunek liczby zregenerowanych roślin do liczby wykładanych na pożywki zalążków lub zarodków. W kombinacjach krzyżówkowych, w których otrzymano zregenerowane rośliny efektywność ta wynosiła odpowiednio: w kulturach zalążkowych od 2,2 do 15,4%, natomiast w kulturach zarodkowych od 3,1 do 18,2%. Szczegółowe dane dotyczące efektywności regeneracji w kulturach zalążkowych i zarodkowych *in vitro* dla kombinacji krzyżowań, z których otrzymano zregenerowane rośliny zestawiono w tabeli 1.

W krzyżowaniach, w których formę mateczną stanowiły obydwie podgatunki *B. campestris* ze względu na wczesne zamieranie łuszczyzn prowadzono tylko kultury zalążkowe. Zregenerowane rośliny otrzymano z krzyżowania *B. campestris* ssp. *sarson* z: brokułem (*B. oleracea* var. *botrytis*), rzepakiem jarym (*B. napus* var. *oleifera*) odmianą Stellar oraz z dzikim gatunkiem *B. fruticulosa*. W przypadku krzyżowań z brokułem i *B. fruticulosa* zregenerowane rośliny otrzymano tylko po zastosowaniu wariantu zapylenia „B” — po usunięciu znamienia słupka. Natomiast w wyniku krzyżowań *B. campestris* ssp. *sarson* z *B. napus* odmianą Stellar zregenerowane rośliny otrzymano stosując zapylenie na znamię słupka. W krzyżowaniu, w którym jako formę mateczną użyto drugi z badanych podgatunków *B. campestris*, tj. *ssp. chinensis* otrzymano zregenerowane rośliny mieszańcowe po zapyleniu pyłkiem rzepaku ozimego — MAH 1690 oraz obydwoma genotypami *B. fruticulosa*. W każdym z powyższych przypadków zregenerowane rośliny otrzymano po zastosowaniu zapylenia na znamię słupka (A). Zapylenie na skrócony słupek (B) *B. campestris* ssp. *chinensis* powodowało jego obumieranie przed upływem siedmiu dni od zapylenia, dlatego ten sposób zapylenia był nieskuteczny w krzyżowaniach tego gatunku.

Tabela 1

Efektywność kultur zalążkowych i zarodkowych wyrażona procentem zregenerowanych roślin w stosunku do liczby inkubowanych zarodków lub zalążków z krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica* przy zastosowaniu dwóch sposobów zapylania — *The efficiency of in vitro ovules and isolated embryo cultures presented as the ratio of regenerated plants to isolated embryos or ovules from wide hybridization of Brassica species after application of two variants of pollination*

Wariant Variant **	Kombinacja krzyżowania* Crossing combination		Liczba izolowanych: No. of isolated:		Efektywność kultur [%]: Efficiency of:	
	forma mateczna maternal form	forma ojcowska paternal form	zalążków ovules	zarodków embryos	zalążkowych ovules culture	zarodkowych embryo rescue
A B	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	8 29	— —	0,0 10,3	— —
A B		<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (STELLAR)	49 10	— —	6,1 0,0	— —
A B		<i>B. fruticulosa</i> 7	6 8	— —	0,0 12,5	— —
A B	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (MAH 1690)	15 0	— —	6,7 —	— —
A B		<i>B. fruticulosa</i> 3	11 0	— —	9,1 —	— —
A B		<i>B. fruticulosa</i> 7	18 0	— —	11,1 —	— —
A B	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	8 9	— —	12,5 11,1	— —
A B		<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (STELLAR)	21 16	— —	14,3 6,3	— —
A B		<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (LEO)	17 28	— —	5,9 3,6	— —
A B		<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (MAH 1690)	38 51	— —	5,3 3,9	— —
A B		<i>B. napus</i> (White Flower)	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	32 34	— 11	12,5 2,9
A B		<i>B. fruticulosa</i> 7	20 19	— —	5,0 10,5	— —
A B	<i>B. napus</i> (Stellar)	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	43 13	25 —	4,7 15,4	12,0 —
A B		<i>B. fruticulosa</i> 7	23 12	19 —	0,0 0,0	5,3 —
A B	<i>B. napus</i> (Leo)	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	18 16	21 14	0,0 0,0	9,5 0,0
A B		<i>B. fruticulosa</i> 3	— 15	48 —	— 6,7	0,0 —
A B	<i>B. napus</i> (MAH 1690)	<i>B. fruticulosa</i> 3	— 15	48 —	— 6,7	0,0 —

ciąg dalszy tabeli 1

A	<i>B. fruticulosa</i> (ekotyp 3)	<i>B. napus</i> (WHITE FLOWER)	38	12	5,3	16,7
B			24	5	0,0	6,7
A		<i>B. napus</i> (STELLAR)	39	22	10,3	13,6
B			6	–	0,0	–
A	<i>B. fruticulosa</i> (ekotyp 7)	<i>B. napus</i> (LEO)	60	36	13,3	13,9
B			17	–	0,0	–
A		<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (MAH 1690)	45	39	2,2	0,0
B			30	–	0,0	–
A	<i>B. fruticulosa</i> (ekotyp 7)	<i>B. napus</i> (STELLAR)	7	–	14,3	–
B			4	–	0,0	–
A		<i>B. napus</i> (LEO)	43	6	14,0	16,7
B			6	–	0,0	–
A	<i>B. fruticulosa</i> (ekotyp 7)	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> (MAH 1690)	21	31	9,5	3,1
B			19	–	0,0	–

* w tabeli uwzględniono tylko kombinacje krzyżówkowe, z których otrzymano zregenerowane w kulturach in vitro rośliny — *the table includes only successful cross combinations with plants regenerated in in vitro cultures*

** A — zapylenie na znamię słupka — *pollination on the stigma*

B — zapylenie na szyjkę w miejscu odcięcia znamienia — *pollination on the style after cutting off the stigma*

*** w nawiasach podano nazwy odmian lub rodów — *in the brackets names of cultivars or strains are given*

W kombinacjach krzyżówkowych, w których jako formę maticzną użyto brokuł — *B. oleracea* var. *botrytis*, a zapylaczami były *B. campestris* ssp. *sarson* i *B. napus* (odmiany Stellar i Leo oraz ród MAH 1690) efektywne okazały się zarówno zapylenia na znamię słupka (A) jak i na skrócony słupek (B), jednak zawsze lepszy wynik obserwowano, gdy stosowano zapylenie na znamię słupka. W każdej z badanych kombinacji sukcesem zakończyły się tylko kultury zalążkowe.

Krzyżowania z wykorzystaniem *B. napus* i *B. fruticulosa* jako żeńskiego komponentu były jedynymi, w których zarodki osiągały minimalne stadium rozwojowe (LH) umożliwiające zastosowanie kultur zarodkowych. Zregenerowane rośliny, w których *B. napus* użyto jako formę maticzną otrzymano po zastosowaniu zapylenia pyłkiem *B. campestris* ssp. *sarson* oraz *B. fruticulosa*. Efektywność regeneracji roślin w kulturach zarodkowych była zawsze wyższa niż w kulturach zalążkowych. Zastosowanie wariantu „B” zapylenia było szczególnie efektywne w krzyżowaniu odmiany rzepaku jarego White Flower z *B. campestris* ssp. *sarson* — w kulturach zarodkowych uzyskano ponad 18% zregenerowanych roślin. Natomiast w krzyżowaniu odmiany Leo z *B. fruticulosa* 3 i rodu MAH 1690 z *B. fruticulosa* 3 zregenerowane rośliny otrzymano tylko po zapyleniu na skrócony słupek (wariant „B”) i przy zastosowaniu kultur zalążkowych.

Użycie obydwu ekotypów (3 i 7) dzikiego gatunku *B. fruticulosa* jako żeńskiego komponentu krzyżowań było efektywne tylko po zapyleniu pyłkiem

roślin *B. napus*. Rośliny z kultur *in vitro* otrzymano po zapyłaniu 3. ekotypu *B. fruticulosa* pyłkiem wszystkich czterech form *B. napus*. Po zapyłaniu pyłkiem trzech odmian *B. napus*: Stellar, White Flower, i Leo zregenerowane rośliny otrzymano zarówno z kultur zalążkowych jak i zarodkowych. Wyjątkiem była kombinacja *B. fruticulosa* 3 × *B. napus* — ród MAH 1690, w której skuteczne były tylko kultury zalążkowe. Wariant zapyłania na szyjkę słupka bez znamienia (B) u *B. fruticulosa* umożliwił otrzymanie mieszańców tylko w jednej kombinacji — *B. fruticulosa* 3 × *B. napus* odmiana White Flower, po zastosowaniu kultur zarodkowych. Dla ekotypu 7. *B. fruticulosa* w odróżnieniu od ekotypu 3. nie otrzymano roślin z krzyżowań z jarą odmianą White Flower. Trzy pozostałe kombinacje krzyżowań z *B. napus* były efektywne.

Z krzyżowania *B. fruticulosa* 7 z formami ozimymi *B. napus* uzyskano zregenerowane rośliny w kulturach *in vitro* zarówno zalążkowych jak i zarodkowych. Natomiast po zapyłaniu jarą odmianą Stellar zregenerowane rośliny otrzymano tylko z kultur zalążkowych.

W żadnym z wariantów zapyłania w kombinacjach krzyżówkowych z udziałem *B. hirta* nie otrzymano roślin.

Kultury zarodków roślinnych zainicjowali w początkach dwudziestego wieku Hännig (1904) i Brown (1906). W latach czterdziestych Overbeek i in. (1941) stwierdzili przydatność mleczka kokosowego w pożywce w stymulowaniu rozwoju zarodków. Technika hodowli zarodków w warunkach *in vitro* została zastosowana po raz pierwszy w 1925 roku przez Laibacha do uzyskania roślin mieszańcowych w rodzaju *Linum*, a w 1959 roku Nishi i in. zaadoptowali ją do gatunków z rodzaju *Brassica* (Wojciechowski 1998). Od tego czasu systematycznie wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem kultur *in vitro* do otrzymywania mieszańców oddalonych u *Brassica*. Za pomocą kultur zarodkowych udało się otrzymać mieszańce z takich krzyżowań oddalonych jak: *B. pekinensis* × *B. campestris* (Inomata 1967), *B. juncea* × *B. napus* (Bajaj i in. 1986), *B. alboglabra* × *B. campestris* (Chen i in. 1988), *B. juncea* × *B. napus* (Zhang i in. 2003).

Zarodki roślinne mogą być poddawane kulturze *in vitro* bez izolacji, przez umieszczenie na pożywce w kilka dni po zapyleniu całych zalążków. W 1958 roku kultury izolowanych zalążków w rodzaju *Papaver* założył Meheswari. Kultury te były skuteczne nawet po wyłożeniu dwukomórkowych zarodków. W rodzaju *Brassica*, zregenerowane rośliny z kultur zalążkowych otrzymano między innymi w kombinacjach: *B. chinensis* × *B. pekinensis* (Inomata 1968), *B. oleracea* × *B. campestris* (Harberd 1969), *B. campestris* × *B. oleracea* (Inomata 1977, Matsuzawa 1978, Diederichsen i Sacristian 1994, Wojciechowski i in. 2001).

W doniesieniach literaturowych mało jest informacji o efektywnych krzyżowaniach z wykorzystaniem *B. hirta* (Sridevi i Sarla 2005), ale i w tym przypadku zastosowanie kultur zalążkowych umożliwiło uzyskanie zregenerowanych mieszańców oddalonych.

Możliwość wykorzystania oleju rzepakowego w różnych gałęziach przemysłu sprawia, że krzyżowanie oddalone wspierane przez techniki bazujące na kulturach *in vitro* spełnia coraz większą rolę w zwiększeniu zmienności u tego gatunku. Na drodze krzyżowań oddalonych osiągnięto już wiele sukcesów w hodowli rzepaku. Do największych osiągnięć można bez wątplenia zaliczyć introgresję cechy męskiej sterylności do genomu rzepaku. W rodzaju *Brassica* istnieje wiele źródeł męskiej sterylności (CMS) oraz samoniezgodności (SI), ale najpowszechniej wykorzystywanym systemem kontrolującym zapylenie krzyżowe u rzepaku jest system CMS Ogura. System ten został wyprowadzony na drodze krzyżowań generatywnych rzepaku z *Raphanus sativus* (Bannerot i in. 1974).

Modyfikacja składu kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym to kolejny cel w hodowli tego gatunku, dla realizacji którego wykorzystuje się krzyżowania oddalone. O możliwości istotnych zmian w kompozycji kwasów tłuszczowych na drodze krzyżowania rzepaku z *B. alboglabra* donoszą Chen i Heneen (1989). Lu i in. (2001) wskazał, że resynteza rzepaku na drodze krzyżowań oddalonych różnych form botanicznych *B. campestris* z *B. oleracea* może być jednym ze sposobów modyfikacji składu kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym.

Wiele ważnych z użytkowego punktu widzenia cech, takich jak odporność na choroby i szkodniki oraz tolerancja na warunki stresowe występuje u dzikich gatunków. Cechy te można wprowadzić do form uprawnych na drodze krzyżowania oddalonego. W rodzaju *Brassica* istnieje wiele dzikich gatunków, które posiadają wartościowe cechy użytkowe, jak np. *B. hirta* (odporność na nicienie i suszę), *B. tournefortii* (odporność na choroby grzybowe, mszyce), *B. fruticulosa* (odporność na słodyszka rzepakowego). Z uwagi na posiadane cechy powyższe gatunki są często wykorzystywane w programach hodowlanych, których celem jest zwiększenie odporności rzepaku na stesy biotyczne i abiotyczne (Wojciechowski i in. 2006).

Obniżenie zawartości włókna w nasionach to kolejny cel w hodowli rzepaku. Wiąże się to z uzyskaniem żółtej barwy nasion, a to z kolei ze zwiększeniem udziału tłuszczu w nasionach. Cecha żółtonasienności jest często spotykana u wielu gatunków rodzaju *Brassica*. Rzepak jest jednym z nielicznych gatunków tego rodzaju, u którego jasna barwa nasion nie występuje w naturze. Stąd też wydaje się, że jednym z głównych sposobów introdukcji tej cechy do rzepaku może być krzyżowanie oddalone z gatunkami o żółtej okrywie nasiennej (Chen i in. 1988).

Krzyżowanie oddalone ma na celu otrzymanie potomstwa wykazującego wyższe wartości pożądanych cech, niż te obserwowane u roślin rodzicielskich.

Wykorzystanie krzyżowań oddalonych dzięki zastosowaniu technik kultur *in vitro*, umożliwia współczesnym hodowcom introdukcję wartościowych cech nawet z odległych genetycznie gatunków, a w efekcie ciągle polepszanie wartości gospodarczej gatunku *Brassica napus*.

Wnioski

1. Zalety metody kultur *in vitro* zalążków czynią je obok kultur zarodkowych ważnym narzędziem w przewyciężaniu postzygotycznych barier niekrzyżowalności w rodzaju *Brassica*.
2. Zastosowanie zalążkowych kultur *in vitro* umożliwiło otrzymanie mieszańcowych roślin w kombinacjach krzyżówkowych, w których łuszczyzny obumierały zanim zarodki osiągnęły stadium rozwojowe umożliwiające ich izolowanie do kultur zarodkowych.

Literatura

- 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.
- Bannerot H., Boulidard L., Cauderon Y., Tempe J. 1974. Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus* to *Brassica*. *Proc. Eucarpia Meet Crop Sect. Cruciferae*, 25: 552-554.
- Bieńkowska-Mochtak E. 1982. Zastosowanie kultur *in vitro* w uprawie i hodowli roślin. PWN, Warszawa: 1-174.
- Brown H.T. 1906. On the culture of excised embryos of barley on nutrient solution containing nitrogen in different forms. *Trans. Guinness Lab.*, 1: 288-289. Cytat za: Wojciechowski A. 1998.
- Chen B.Y., Heneen W.K., Jönsson R. 1988. Resynthesis of *Brassica napus* L. through interspecific hybridization between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with special emphasis on seed colour. *Plant Breeding*, 101: 52-59.
- Chen B.Y., Heneen W.K. 1989. Fatty acid composition of resynthesized *Brassica napus* L., *B. campestris* L., *B. alboglabra* Bailey with special reference to the inheritance of erucic acid content. *Heredity*, 63: 309-314.
- Diederichsen E.M., Sacristian M.D. 1994. The use of ovule culture in reciprocal hybridization between *B. campestris* and *B. oleracea*. *Plant Breeding*, 113: 79-82.
- Harberd D.J. 1969. A simple effective embryo culture technique for *Brassica*. *Euphytica*, 18: 425-429.
- Hännig E. 1904. Zur Physiologische pflanzlicher Embryonen. I. Über die Cultur von *Cruciferen* Embryonen ausserhalb des embryosacks. *Btg. Ztg.*, 62: 45-80. Cytat za: Wojciechowski A. 1998.
- Inomata N. 1967. Production of triploid hybrids of *Brassica* by embryo culture. *Jap. J. Breed.* 27: 295-304.
- Inomata N. 1968. *In vitro* culture of ovaries of *Brassica* hybrids between 2x and 4x. I. Culture medium. *Jap. J. Breed.*, 18: 139-148.
- Inomata N. 1977. Production of interspecific hybrids between *B. campestris* and *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. I. Development of excised ovaries in various culture media with yeast extract and casein hydrolysate. *Jap. J. Breed.*, 27 (4): 295-304.
- Karpechenko G.D. 1924. Hybrids of *Raphanus sativus* x *Brassica oleracea* L. *J. Genet.*, 14: 375-396.
- Keller W.A., Armstrong K.C. 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther culture. *Can. J. Bot.*, 55/10: 1383-1388.

- Laibach F. 1925. Das Taub werden non Bestardsamen und die Kunstliche Aufzucht fruh absterbender Bastard embryonen. Zeitschr. Bot., 17: 417-459.
- 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.
- Matsuzawa Y. 1978. Studies on interspecific hybridization in genus *Brassica*. Part I. Effect of temperature on the development of hybrid embryos and the improvement of crossability by ovary culture in interspecific cross *B. campestris* x *B. oleracea*. Jap. J. Breed., 28: 186-196.
- Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., Przybecki Z. 1989. Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin. PWN, Warszawa: 1-283.
- Maheshwari N. 1958. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. Science (Wash D.C.): 127-342. Cytat za: Embryology of Angiosperms. Ed. B.M. Jahri, Springer-Verlag 1984.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revisited medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nishi S., Kwata J., Toda M. 1959. On the breeding of interspecific hybrids between two genomes "c" and "a" of *Brassica* through application of embryo culture techniques. Jap. J. Breed., 8: 215-222.
- Nitsh J.P., Nitsh C., Hamon S. (1969): Production de *Nicotiana* diploids a partir de cals haploides cultives in vitro. C.R. Acad. Sci. Paris, 269: 1275-1278.
- Overbeek J. van, 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. Cytat za: Wojciechowski 1998.
- Springer B., Wojciechowski A. 2004. Ocena możliwości wyeliminowania barier prezygotycznych w krzyżowaniach oddalonych trzech gatunków z rodzaju *Brassica*. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXV: 67-75.
- Sridevi O., Sarla N. 2005. Production of intergeneric hybrids between *Sinapis alba* and *Brassica carinata*. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 839-845.
- White P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cell. The Ronald Press, New York: 119-128.
- Wojciechowski A. 1998: Zdolności regeneracyjne wybranych genotypów *Brassica* w kulturach in vitro. Roczniki AR Poznań. Rozprawy naukowe, 289: 1-58.
- Wojciechowski A., Maślankiewicz J., Youping Ch., Kwapiszewska M., Springer B. 2001. Kultury in vitro izolowanych zarodków i zalążków z krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*. Biotechnologia, 2 (53): 86-89.
- 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 Agrobiology and Molecular Genetics „Mieszańce oddalone roślin uprawnych”. Ed. W. Sodikiewicz, T. Sodikiewicz, M. Surma, Instytut Genetyki Roślin PAN, 7: 107-114.
- Zhang G.Q., Zhou W.J., Gu H.H. Song W.J., Momoh J.J. 2003. Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture. J. Agr. And Crop Sci., 189 (5): 347-350.