

Andrzej Wojciechowski, Lidia Lewandowska

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

Ocena efektywności krzyżowań oddalonych linii MS *B. napus* L. z gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej z zastosowaniem kultur zarodkowych

The evaluation of crossability in wide crosses of MS line *B. napus* L. with yellow and brown seeded species *Brassica* with applying embryo culture

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, barwa nasion, *Brassica napus*, krzyżowanie międzygatunkowe

W prezentowanej pracy oceniano zgodność krzyżową w międzygatunkowych krzyżowaniach *B. napus* var. *oleifera* (męskosterylna linia MS-8, $2n = AACC = 38$) z czterema gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej, tj. *B. campestris* ssp. *sarson* (żółtonasienny rzepak jary, $2n = AA = 20$), *B. campestris* ssp. *pekinensis* (kapusta pekińska, $2n = AA = 20$), *B. hirta* (gorczyca biała, $2n = SS = 24$) i *B. carinata* (gorczyca etiopska, $2n = BBCC = 34$). Krzyżowanie wyżej wymienionych gatunków przeprowadzono w szklarni. Zgodność krzyżową pomiędzy gatunkami użytymi w eksperymencie oceniono na podstawie obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych oraz wiązania nasion w warunkach *in vivo* i regeneracji roślin z zarodków hodowanych w warunkach *in vitro*. Mieszańcowe nasiona F_1 oraz rośliny mieszańcowe F_1 zregenerowane w kulturach zarodkowych otrzymano w trzech spośród czterech wykonanych kombinacji krzyżowań. Całkowicie nieefektywne okazało się krzyżowanie linii MS z gorczycą białą. Mieszańce F_1 otrzymane z kultur zarodkowych okazały się całkowicie męskosterylne. Zawięzały jednak nasiona po zapyleniu pyłkiem gatunków użytych w eksperymencie. Obserwacje mikrosporogenezy u mieszańców F_1 wykazały normalne formowanie tapetum i tkanki archesporialnej oraz obecność zaburzeń w koniugacji chromosomów i ich rozchodzeniu się do jąder potomnych.

Key words: winter oilseed rape, *Brassica napus*, seed colour, interspecific crossing

In this work the crossability in interspecific crosses of MS line of *B. napus* var. *oleifera* (male sterile line MS-8, $2n = AACC = 38$) with four yellow and brown seeded species of *Brassica* i.e. *B. campestris* ssp. *sarson* (yellow seeded turnip rape, $2n = AA = 20$), *B. campestris* ssp. *pekinensis* (brown seeded pekinensis cabbage, $2n = AA = 20$), *B. hirta* (white mustard, $2n = SS = 24$) and *B. carinata* (Ethiopian mustard, $2n = BBCC = 34$) was investigated. The crossing of the above mentioned species was done in the greenhouse. The crossability of used species was evaluated on the basis of observations of pollen grains germination, pollen tube growth and seed set in *in vivo* conditions and regeneration of plants in *in vitro* conditions. Hybrid F_1 seeds and hybrid F_1 plants regenerated in embryo culture were obtained from three out of four cross combinations. The crossing of MS line with white mustard was quite ineffective. F_1 hybrid plants obtained from embryo culture were male sterile. However, they set seeds after pollination with pollen of species used in the experiment for rapeseed pollination. The observation of microsporogenesis in F_1 hybrid plants showed that they formed normal tapetum and archesporial tissue but there were disturbances in chromosome conjugation and their distribution into descendant nuclei.

Wstęp

Rodzaj *Brassica* obejmuje kilka ważnych gatunków uprawnych roślin oleistych, spośród których rzepak ozimy (*B. napus*) jest najważniejszym pod względem ekonomicznym. Celem wielu programów hodowlanych jest zwiększenie plonu oleju z jednostki powierzchni poprzez wzrost plonu nasion oraz zawartości tłuszczu w nasionach. Jednym ze sposobów zwiększenia zawartości tłuszczu w nasionach jest zmniejszenie udziału okrywy nasiennej w nasieniu. Udział okrywy nasiennej w całości nasienia u *Brassica* jest powiązany z barwą okrywy nasiennej. Czarne nasiona posiadają znacznie grubszą okrywę w porównaniu z nasionami żółtymi, co powoduje, że udział okrywy nasiennej w nasieniu jest w ich przypadku proporcjonalnie wyższy (Stringam i in. 1974). Ponadto z żółtą barwą okrywy nasiennej łączy się podwyższona zawartość tłuszczu i białka oraz obniżona zawartość włókna, co znacznie poprawia wartość odżywczą śruty pozostającej po ekstrakcji tłuszczu (Shirzadegan i Röbbelen 1985, Tang i in. 1997, Meng i in. 1994, Słominski i in. 1999, Rahman 2001, Ochodzki i Piotrowska 2002).

Żółta barwa okrywy nasiennej jest cechą spotykaną u wielu gatunków rodzaju *Brassica*. Rzepak (*B. napus* var. *oleifera*) jest jedynym gatunkiem z tego rodzaju, u którego nie spotyka się form żółtonasiennych w naturze. Stąd też wydaje się, że jednym z głównych sposobów introdukcji tej cechy do rzepaku może być krzyżowanie oddalone rzepaku z gatunkami o żółtej lub brązowej okrywie nasiennej (Chen i in. 1988). Krzyżowanie oddalonych genetycznie form dość często następuje wiele problemów i kończy się niepowodzeniem w uzyskaniu mieszańców (Springer 2004). Trudności te w niektórych przypadkach można pokonać wykorzystując metodę kultur *in vitro* izolowanych zarodków. Celem niniejszej pracy było otrzymanie mieszańców oddalonych poprzez krzyżowanie różnych gatunków rodzaju *Brassica* i próba przeniesienia cechy żółtej barwy okrywy nasiennej z form żółto- i brązowonasiennych *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* var. *oleifera*).

Material roślinny i metodyka pracy

Gatunkami *Brassica* użytymi w krzyżowaniach oddalonych były: żółtonasienny rzepik jary *B. campestris* ssp. *sarson* (AA = 20) i gorczyca biała *B. hirta* (*S. alba*, SS = 24), jasnobrązowa gorczyca etiopska *B. carinata* (BBCC = 34) i kapusta pekińska *B. campestris* ssp. *pekinensis* (AA = 20) oraz czarnonasienna męskosterylna linia rzepaku ozimego *Brassica napus* var. *oleifera* (linia MS-8, AACC = 38). Męskosterylna linia MS-8 została wyselekcjonowana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu w pokoleniu F₈ mieszańców powstałych z krzyżowania brukselki (*B. oleifera* var. *gemmifera* L., CC = 18) z kapustą chińską (*B. campestris*

ssp. *chinensis*, AA = 20). Pozostałe gatunki użyte do krzyżowań otrzymano z banku genów z Horticulture Research International, Wellsbourne w Anglii.

Krzyżowanie roślin wykonano w okresie wiosennym w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu. Dla części zapylonych słupków wykonano obserwacje kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych, z pozostałych izolowano zarodki do hodowli *in vitro*. Resztę zapylonych kwiatów pozostawiono na roślinie w celu oszacowania efektywności krzyżowania w warunkach *in vivo*.

W całym cyklu badawczym wykonano obserwacje dotyczące oceny:

- 1) zdolności kojarzeniowej na podstawie wzrostu łagiewek pyłkowych;
- 2) efektywności krzyżowania w oparciu o liczbę uzyskanych łuszczyń i nasion oraz liczbę zalążków zawierających zarodki, które zostały wyłożone na pożywkę;
- 3) efektywności hodowli zarodków *in vitro* w oparciu o liczbę zregenerowanych roślin;
- 4) charakterystyki cech morfologicznych oraz analiz podziałów mitotycznych i mejotycznych u roślin pokolenia F₁.

Obserwacje kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych wykonano przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Z każdej kombinacji utrwalono w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoya po 10 słupków po upływie: 6, 12, 24 i 46 godzin od zapylenia. Preparaty wykonywano zgodnie z metodą opisaną przez Martina (1959).

Ocenę kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu słupka i kiełkowania łagiewek pyłkowych w szyjkach słupków określono w skali 6-stopniowej (Mackiewicz i in. 1979), gdzie:

- 0 — oznacza brak łagiewek,
- 1–4 — pośrednie ilości łagiewek,
- 5 — łagiewki bardzo liczne.

Kultury zarodkowe prowadzono na pożywkach Murashige-Skoog'a (MS; 1962), Murashige-Skooga'a w modyfikacji Kellera (MS_k; Keller i Armstrong 1977) oraz Nitsha i Nitsha (H₃; Nitsh i in. 1969). W zależności od kombinacji krzyżowania, zarodki izolowano z łuszczyń uprzednio powierzchniowo sterylizowanych w 70 i 95% alkoholu etylowym w stadium od późnej torpedy do prawie dojrzałego (14–18 dni po zapyleniu). Inkubacja zarodków przebiegała w pokoju hodowlanym w stałej temperaturze 26°C i fotoperiodzie 16 godzin faza jasna i 8 godzin faza ciemna. Ukorzenione rośliny przesadzono do małych doniczek i ich dalszą hodowlę prowadzono w warunkach szklarniowych.

Efektywność kultur zarodkowych wyrażono procentowym stosunkiem liczby zregenerowanych roślin na pożywce H₃ oraz roślin ukorzenionych w glebie w odniesieniu do liczby zarodków wyłożonych na pożywkę inicjującą.

Metodą opisową wykonano obserwacje cech morfologicznych: pokroju roślin, kształtu liści, budowy kwiatów i porównano je z roślinami rodzicielskimi.

Proces mejozy u mieszańców F_1 analizowano w preparatach rozmazowych wykonanych metodą LPO (Deyer 1936, Wojciechowski 1985b). Podczas analizy podziałów mejotycznych zwracano szczególną uwagę na obecność lub brak zaburzeń, zachowanie się chromosomów w poszczególnych stadiach oraz liczbę chromosomów.

Proces mitozy u mieszańców F_1 obserwowano w preparatach rozmazowych wykonanych ze stożka wzrostu korzenia dla pięciu roślin z każdej kombinacji krzyżowania. Korzonki pobierano bezpośrednio z doniczek i utrwalano w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoya. Macerację wykonano w mieszaninie 96% alkoholu etylowego i stężonego HCl w stosunku 3 : 1 przez 30 minut. Po płukaniu w lodowatej wodzie korzonki barwiono na gorąco w 2% orceinie octowej przez 30 minut.

Wyniki

Ocena zdolności kojarzeniowej na podstawie kiełkowania łagiewek pyłkowych

Na podstawie uzyskanych wyników (tab. 1) można stwierdzić, że jedynie gorczyca biała (*B. hirta*) początkiem, jak i intensywnością kiełkowania łagiewek pyłkowych odbiegała od 3 pozostałych zapylaczy: *B. carinata*, *B. campestris* ssp. *sarson* i ssp. *pekinensis*.

Najintensywniejsze kiełkowanie ziaren pyłku na znamieniu po 24 i 46 godzinach od zapylenia obserwowano w kombinacji, w której zapylaczem była *B. campestris* ssp. *sarson* (4,0). Nieco słabszą formą zapyłającą była *B. carinata* (3,0 po 24 i 3,6 po 46 godzinach od zapylenia). Najsłabszą zgodność obserwowano w krzyżowaniach, gdy zapylaczem była *B. hirta* — 1,0 po 24 oraz 1,7 po 46 godzinach od zapylenia. W przypadku krzyżowań *B. napus* z *B. hirta* obserwowano jedynie krótkie łagiewki pyłkowe na znamieniu i całkowity ich brak w głębszych częściach słupka.

Obecność łagiewek pyłkowych w zalążni obserwowano dopiero po 46 godzinach od zapylenia w przypadku dwóch kombinacji: *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* (0,7) oraz *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (0,3) (tab. 1). Wnikanie do zalążków łagiewek pyłkowych obserwowano jedynie dla zapylacza *B. campestris* ssp. *sarson* i były to raczej rzadkie przypadki.

Tabela 1

Stopień kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu oraz wnikania łagiewek pyłkowych (ŁP) w poszczególne części słupka w krzyżowaniach męskosterylnej linii MS-8 *B. napus* z czterema innymi gatunkami *Brassica* (w skali 6-stopniowej) — *The degree of pollen grain germination on the stigma and pollen tubes (PT) growth in interspecific crosses of male sterile line MS-8 of B. napus with four other Brassica species (in 6 degree scale)*

Roślina mateczna <i>B. napus</i> linia MS-8 — Maternal plant line MS-8					
zapylnacz <i>pollinator</i>	czas po zapyleniu <i>time after pollination</i> [h]	stopień przenikania ŁP w poszczególne części słupka <i>the degree of PT penetration in particular part of the style</i>			
		znamie <i>stigma</i>	szyjka <i>style</i>	załącznia <i>ovary</i>	wnikanie do załączka <i>penetrating into the ovules</i>
<i>B. carinata</i>	6	1,0	0,0	0,0	0,0
	12	3,2	2,1	0,0	0,0
	24	3,0	3,8	0,0	0,0
	46	3,6	3,8	0,0	0,0
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. sarson</i>	6	0,8	0,2	0,0	0,0
	12	3,1	0,9	0,0	0,0
	24	4,0	4,1	0,0	0,0
	46	4,0	4,0	0,7	2,0
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. pekinensis</i>	6	0,0	0,0	0,0	0,0
	12	2,9	2,6	0,0	0,0
	24	3,3	2,9	0,0	0,0
	46	1,4	2,6	0,3	0,0
<i>B. hirta</i>	6	0,0	0,0	0,0	0,0
	12	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	1,0	0,0	0,0	0,0
	46	1,7	0,0	0,0	0,0

Ocena hodowli zarodków mieszańcowych w warunkach *in vitro*

W przeprowadzonym eksperymencie z 63 łuszczyn otrzymano 1377 załączków, z których wyizolowano i wyłożono na pożywki 454 zarodki (tab. 2).

Średnio najwyższą liczbę prawidłowo rozwiniętych załączków w łuszczynie stwierdzono w łuszczynach kombinacji linia MS-8 zapylna pyłkiem *B. carinata* (25.08), natomiast najniższą obserwowano w kombinacji, w której zapylnaczem była *B. campestris* ssp. *pekinensis* (18.12). Odmiennie kształtowała się plenność wyrażona procentowym stosunkiem liczby rozwiniętych zarodków do liczby załączków. Najlepszą plennością cechowała się kombinacja *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (76,55%). Wyjątek stanowiła kombinacja *B. napus* × *B. hirta*, gdzie w żadnym z załączków nie obserwowano zarodków (tab. 2).

Tabela 2

Efektywność krzyżowań oddalonych linii MS-8 rzepaku ozimego z czterema gatunkami *Brassica* wyrażona liczbą powstałych zarodków w stosunku do średniej liczby rozwiniętych zalążków — *The effectiveness of wide crosses of line MS-8 of B. napus with four species of Brassica expressed by no. of developed embryos to mean no. of well developed ovules*

Roślina mateczna <i>B. napus</i> linia MS-8 — Maternal plant line MS-8					
zapylnacz <i>pollinator</i>	liczba łuszczyń <i>no. of siliqua</i>	liczba zalążków <i>no. of ovules</i>	liczba izolowanych zarodków <i>no. of isolated embryos</i>	plenność — <i>fertility</i>	
				średnia liczba załóż- ków w łuszczyńce <i>mean no. of ovules/siliqua</i>	% zarodków do liczby zalążków <i>the percentage of embryos/no. of ovules</i>
<i>B. carinata</i>	24	602	163	25,08	27,08
<i>B. campestris</i> , ssp. <i>sarson</i>	14	304	180	21,71	59,21
<i>B. campestris</i> , ssp. <i>pekinensis</i>	8	145	111	18,12	76,55
<i>B. hirta</i>	17	326	0	19,18	—
Łącznie — <i>General</i>	63	1377	454	—	—

Na pożywce H₃ ukorzeniły się w sumie 262 rośliny, co stanowi 57,92% w stosunku do liczby 454 wyłożonych zarodków. Najwięcej roślin na pożywce H₃ w stosunku do liczby wyłożonych zarodków (tab. 3) uzyskano z kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (62,16%). Nieco mniej ukorzenionych roślin otrzymano z kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* (54,44%) i *B. napus* × *B. carinata* (52,28%).

Ogółem z 454 wyizolowanych zarodków w doniczkach prawidłowo rozwinęło się 196 roślin, co stanowi 45,39% w odniesieniu do ogólnej liczby wyłożonych zarodków. Najwięcej roślin w stosunku do liczby wyłożonych zarodków uzyskano z krzyżowania *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* (47,77%), a najmniej w kombinacji *B. napus* × *B. carinata* (38,03%).

Ocena efektywności krzyżowania oddalonego linii MS-8 *B. napus* z czterema innymi gatunkami *Brassica* w warunkach *in vivo*

W całym doświadczeniu przeprowadzonym w szklarni z 4068 zapylnych kwiatów (tab. 4) otrzymano 2044 łuszczyń (co stanowi 40,62% zapylnych kwiatów). Najwyższą efektywność krzyżowania wyrażoną płodnością (procentowy stosunek łuszczyń do liczby zapylnych kwiatów) obserwowano w kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (69,44%) i *B. napus* × *B. carinata* (59,82%). Niższą płodność obserwowano w kombinacji, gdzie formą zapyłającą była

Tabela 3

Efektywność hodowli zarodków w warunkach *in vitro*
The effectiveness of embryos culture in in vitro conditions

Roślina mateczna <i>B. napus</i> linia MS-8 — Maternal plant line MS-8					
zapylnacz <i>pollinator</i>	liczba izolowanych zarodków <i>no. of isolated embryos</i>	pożywka H ₃ — <i>medium H₃</i>		gleba — <i>soil</i>	
		liczba ukorzenionych roślin <i>no. of rooted plants</i>	% roślin ukorzenionych/ liczbę izolowa- nych zarodków <i>% of rooted plants/no. of isolated embryos</i>	liczba roślin w doniczkach <i>no. of potted plants</i>	% roślin w glebie/liczbę izolowanych zarodków <i>% of plants in the soil/ no. of isolated embryos</i>
<i>B. carinata</i>	163	95	52,28	62	38,03
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. sarson</i>	180	98	54,44	86	47,77
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. pekinensis</i>	111	69	62,16	48	43,24
<i>B. hirta</i>	0	0	0	0	0
Łącznie — <i>General</i>	454	262	57,92	196	45,39

Tabela 4

Efektywność krzyżowań oddalonych linii MS-8 *B. napus* z gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej w warunkach *in vivo* — *The effectiveness of wide crosses between MS-8 line of B. napus and Brassica yellow and brown seeded species in in vivo conditions*

Roślina mateczna <i>B. napus</i> linia MS-8 — Maternal plant line MS-8						
zapylnacz <i>pollinator</i>	płodność — <i>fertility</i>			liczba dorodnych nasion <i>no. of well developed seeds</i> [D]	śr. liczba dorodnych nasion/ łuszczykę średnią no. of well developed seeds/siliqua	współczynnik efektywności krzyżowania <i>coefficient of crossing effectiveness</i> [D/K]
	liczba zapylnych kwiatów <i>no. of pollinated flowers</i> [K]	liczba łuszczynek <i>no. of siliqua</i>	łuszczynek/ zapylnych kwiatów <i>siliqua/pollinated flowers</i> [%]			
<i>B. carinata</i>	799	478	59,82	1331	2,78	1,66
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. sarson</i>	786	337	42,87	3152	9,35	4,01
<i>B. campestris</i> , <i>ssp. pekinensis</i>	1656	1150	69,44	17310	15,05	10,45
<i>B. hirta</i>	827	79	9,55	0	0	0
Łącznie — <i>General</i>	4068	2044	40,62	21793	8,13	4,82

B. campestris ssp. *sarson* (42,87). Natomiast najniższą efektywność krzyżowania stwierdzono w kombinacji, gdzie formą zapylającą była *B. hirta* (9,55%), przy czym żadna z zawiązanych łuszczyń nie zawierała nasion.

Efektywność krzyżowania w warunkach *in vivo* określono również współczynnikiem wyrażającym średnią liczbę uzyskanych nasion w przeliczeniu na zapylony kwiat (tab. 4). W tym przypadku najwyższą efektywność krzyżowania wystąpiła także w kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (10,45). Niższą efektywność obserwowano w kombinacji, gdzie formą zapylającą była *B. campestris* ssp. *sarson* (4,01) oraz *B. carinata* (1,66).

Najwyższy procent prawidłowo wykształconych nasion wystąpił w kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (84,43%) oraz *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* (79,55%), a najmniej prawidłowo wykształconych nasion obserwowano w krzyżówce *B. napus* × *B. carinata* (15,67%) (tab. 5).

Tabela 5

Charakterystyka nasion powstałych z krzyżowań oddalonych linii MS-8 *B. napus* z gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej — *The characterization of seeds from wide crosses between MS-8 line of B. napus and Brassica yellow and brown seeded species*

Roślina mateczna <i>B. napus</i> linia MS-8 — Maternal plant line MS-8							
zapylacz <i>pollinator</i>	stopień wykształcenia nasion <i>the degree of seed development</i>				segregacja barwy nasion <i>the segregation of seed color</i>		
	dorodne <i>well developed</i>	poślad <i>undeveloped</i>	ogółem <i>general</i>	% dorodnych nasion <i>well developed seeds</i> [%]	żółte <i>yellow</i>	brązowe <i>brown</i>	czarne <i>black</i>
<i>B. carinata</i>	1331	7163	8494	15,67	0	87	1244
<i>B. campestris</i> , ssp. <i>sarson</i>	3152	810	3962	79,55	1	13	3138
<i>B. campestris</i> , ssp. <i>pekinensis</i>	17310	3192	20502	84,43	62	184	17064
<i>B. hirta</i>	0	0	0	0	0	0	0

Większość nasion rekombinantów pokolenia F₁ otrzymanych z krzyżowań oddalonych charakteryzowała się czarną barwą okrywy nasiennej, nieliczne nasiona były brązowe (tab. 5). Nasiona żółte otrzymano tylko w obrębie tych kombinacji, gdzie formami zapylającymi były: żółtonasienny *B. campestris* ssp. *sarson* (tylko 1 nasiono) oraz *B. campestris* ssp. *pekinensis* (62 nasiona).

Brązowe nasiona otrzymano z trzech spośród czterech kombinacji krzyżowań. Najwięcej brązowych nasion uzyskano w kombinacji, gdzie formą zapylającą była *B. campestris* ssp. *pekinensis* (184), nieco mniej z kombinacji *B. napus* × *B. carinata* (87). Najmniejszą liczbę brązowych nasion otrzymano z kombinacji, w której zapylaczem był żółtonasienny *B. campestris* ssp. *sarson* (13).

Charakterystyka roślin pokolenia F₁ pod względem cech morfologiczno-rozwojowych

Mieszańce pokolenia F₁ otrzymano z trzech spośród czterech kombinacji krzyżowań. W stadium rozety wszystkie uzyskane rośliny były w morfotypie formy matecznej — *B. napus*. W fazie kwitnienia obserwowano typowy dla form ojcowskich kształt liści łodygowych, wielkość kwiatów oraz kształt płatków korony roślin mieszańcowych. Kwiaty roślin mieszańcowych pokolenia F₁ były męskosterylne.

Obserwacje procesów mejozy i mitozy w pokoleniu F₁

W procesie podziałów mejotycznych zachodzących w komórkach arche-sporialnych mieszańców F₁ z wszystkich kombinacji krzyżowania zaobserwowano liczne zaburzenia. Obserwowano sporadyczne zamieranie komórek archesporialnych w poszczególnych stadiach podziału mejotycznego począwszy od metafazy I oraz w stadium tetrad. Komórki te charakteryzowały się zwartym, zepchniętym ku ścianie jądrem oraz cytoplazmą odchodzącą od ścian komórkowych. W metafazie I podziału mejotycznego obserwowano chromosomy połączone w biwalenty, triwalenty i tetrawalenty oraz zjawisko opóźnionego rozchodzenia się chromosomów do biegunów. Podział mitotyczny w komórkach somatycznych u roślin pokolenia F₁ przebiegał prawidłowo i jedynie w sporadycznych przypadkach obserwowano zaburzenia (mosty chromosomowe). Liczba chromosomów u rekombinantów *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* mieściła się w przedziale od 28 do 32 chromosomów, a w kombinacji *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* od 27 do 34. U mieszańców F₁ *B. napus* × *B. carinata* liczba chromosomów mieściła się w zakresie od 35 do 37.

Dyskusja

Uzyskiwanie nowych, ulepszonych odmian roślin uprawnych jest uwarunkowane w dużej mierze dostępem hodowców do szerokiej puli genowej gwarantującej różnorodność materiału wyjściowego. Źródłem poszerzania zmienności genetycznej mogą być genotypy pozyskiwane w wyniku krzyżowań międzyrodzajowych i międzygatunkowych lub mutagenezy. W przypadku uprawnych gatunków *Brassica* zaobserwowano, że krzyżowanie oddalone — międzygatunkowe i międzyrodzajowe umożliwia introdukcję pożądaných genów z gatunków, które ewolucyjnie brały udział w powstawaniu form amifidiploidalnych. Do takich cech należą: odporność na choroby, samoniezgodność i męska sterylność.

Żółte zabarwienie okrywy nasiennej w rodzaju *Brassica* jest związane z podwyższoną zawartością tłuszczu i białka oraz obniżoną zawartością włókna (Jönsson

i Bengtsson 1970, Stringam i in. 1974). W nasionach rzepaku łuska nasienna stanowi od 16,5 do 18,7% s.m., co oznacza, że odtłuszczona śruta rzepakowa zawiera jej około 30% (Bell i Shires 1982). Obniżenie zawartości włókna w nasionach poprzez wprowadzenie do uprawy odmian z cieńszą okrywą nasienną mogłoby zwiększyć strawność śruty i jednocześnie polepszyć wartość odżywczą paszy. Intensywny rozwój badań nad uzyskaniem żółtonasiennej formy rzepaku pozwolił określić, iż cecha żółtej barwy okrywy nasiennej jest cechą niestabilną o szerokim zakresie zmienności i złożonym sposobie dziedziczenia (Rahman i in. 2001, Heneen i Brismar 2001, Tang i in. 1997, Liu i in. 1991).

W niniejszej pracy analizie poddano mieszańce pokolenia F_1 uzyskane w wyniku kontrolowanego zapylenia męskosterylnego rzepaku ozimego z czterema gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej. Wyniki obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka wskazują, że najwyższą zgodność krzyżową obserwowano w kombinacjach, gdzie jako formę ojcowską użyto *B. campestris* ssp. *sarson* oraz *B. campestris* ssp. *pekinensis*. Podobnie wysoką zgodność dotyczącą wymienionych wyżej kombinacji krzyżowania obserwowali w swoich badaniach Wojciechowski i in. (1997), gdzie stopień wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka był wysoki i wynosił 4, w przyjętej 6-stopniowej skali. W prezentowanej pracy najmniej wartościowym zapylnicem okazała się gorczyca biała (*B. hirta*). Pomimo stosunkowo zadowalającego kiełkowania ziaren pyłku gorczycy białej na znamieniu *B. napus* nie zaobserwowano wnikania łagiewek pyłkowych do szyjki i dalszych części słupka. Takie same wyniki uzyskał Springer (2004), który po zapyleniu form jarych *B. napus* pyłkiem *B. hirta* obserwował tylko kiełkujące łagiewki pyłkowe na znamieniu słupka. Krzyżowania *B. napus* z *B. hirta* okazały się całkowicie nieefektywne, pomimo że wspomniany autor zastosował różne warianty zapyłania: na szyjkę w miejscu odcięcia znamienia, w połowie szyjki i na załąźnię.

Wyniki uzyskane przez Wojciechowskiego (1985a) oraz japońskich badaczy (Nishi i in. 1959, Nishiyama i Inomata 1966) wskazują, że skuteczność krzyżowania zależy nie tylko od genomu formy matecznej, ale przede wszystkim od doboru krzyżowanych ze sobą podgatunków. W badaniach własnych najwyższy współczynnik efektywności krzyżowania stwierdzono dla kombinacji, w których formą zapyłającą była *B. campestris* ssp. *pekinensis* oraz *B. campestris* ssp. *sarson*. Podobnie wysoką efektywność krzyżowania (wyrażoną procentem nasion do liczby zapylnionych kwiatów) dla kombinacji *B. napus* × *B. campestris* (28,5%) zaobserwowali Wojciechowski i in. (1997).

W hodowli roślin otrzymanie mieszańców oddalonych jest utrudnione i często niemożliwe. W praktyce hodowlanej, aby pokonać bariery niekrzyżowalności stosuje się różnego rodzaju techniki kultur *in vitro*: zarodków, załąźni i załążków. W realizowanych badaniach poprzez zastosowanie kultur *in vitro* izolowanych

zarodków otrzymano mieszańce z wielu kombinacji krzyżowań. Jednak wydajność kultur zarodkowych była zróżnicowana, co wynikało z kombinacji użytych do krzyżowań gatunków. Natomiast regeneracja roślin uzyskanych z zarodków mieszańcowych przebiegała bez zakłóceń. Nie zaobserwowano żadnych zaburzeń w ich rozwoju na sztucznej pożywce. Różnice w efektywności kultur zarodkowych z poszczególnych kombinacji krzyżowań były najprawdopodobniej spowodowane wpływem genotypu, na co zwraca uwagę w swojej pracy również Wojciechowski (1998).

Większość nasion uzyskanych z krzyżowań oddalonych charakteryzowała się czarną barwą okrywy nasiennej, nieliczne były brązowe i tylko sporadycznie pojawiły się nasiona żółte. Nasiona żółte otrzymano jedynie w obrębie dwóch kombinacji, w których formami zapylającymi były *B. campestris* ssp. *sarson* oraz ssp. *pekinensis*. Pigment zabarwiający okrywę nasienną jest umiejscowiony w palisadowych i parenchymatycznych warstwach łuski (Stringam i in. 1974). Tkanki te rozwijają się z organizmu matecznego, co może tłumaczyć niewielką ilość żółtych nasion. Kolor nasion u *Brassica napus* wg Shirzadegana (1986) jest kontrolowany przez trzy pary genów BL1, BL2 i BL3. Nasiona o żółtej barwie okrywy nasiennej pojawiają się wówczas, gdy allele wszystkich trzech loci są w układzie homozygoty recesywnej. Meng i in. (1994) podjęli próbę przeniesienia cechy żółtego koloru okrywy nasiennej z gatunków *B. campestris* i *B. carinata* do *B. napus* i stwierdzili, że ekspresja zabarwienia okrywy nasiennej u mieszańców może być rezultatem współdziałania alleli z poszczególnych genomów. Model dziedziczenia barwy nasion u *B. napus* jest zupełnie odmienny od poznanego u *B. campestris* (Chen i in. 1988). Pewną rolę spełniają tu ruchome elementy genetyczne, zbliżone do transpozonów stwierdzonych u kukurydzy, odpowiedzialnych za niejednorodność barwy (Liu i in. 1991).

Z badań przeprowadzonych przez Håkanssona (1959) i Olsson'a (1960) oraz Wojciechowskiego (1985a i b) wynika, iż najczęstszą przyczyną zamierania zarodków z krzyżowań oddalonych w obrębie *Cruciferae* jest niekompletny rozwój endospermu. Jak podaje Wojciechowski (1985b) przyczyną zamierania zarodków z krzyżowań różnych form *B. campestris* był również nadmierny przerost tkanki somatycznej (hyperplasis), który odcinał dopływ substancji odżywczych dla rozwijającego się zarodka. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy dowodzą, że w kombinacji *B. napus* × *B. hirta* najbardziej prawdopodobną przyczyną nieotrzymania nasion mieszańcowych było zablokowanie wnikania łagiewek pyłkowych do zalążków, gdyż nie zaobserwowano ich w głębszych częściach słupek. Jednak w wyniku zapylenia linii MS rzepaku pyłkiem *B. hirta* obserwowano wiązanie łuszczyń o typowych nabrzmieniach sugerujących obecność w nich zalążków z uformowanymi zarodkami. Zarodki te najprawdopodobniej zamierały w bardzo wczesnym stadium rozwojowym. Wskazuje na to całkowity brak nasion ostatnich w wyrosniętych łuszczyinach. W przypadku tej kombinacji w przy-

szłości należałoby zastosować kultury zalążkowe, które być może pozwolą na kontynuowanie rozwoju bardzo młodego zarodka w warunkach *in vitro*. Nie można jednak również wykluczyć takiej możliwości, że zapylenie obcym pyłkiem pobudzało zalążnię do wzrostu, mimo braku zapłodnienia.

Wnioski

1. Zgodność krzyżowa pomiędzy gatunkami użytymi w eksperymencie, ustalona na podstawie obserwacji łagiewek pyłkowych oraz uzyskanej liczby nasion mieszańcowych była stosunkowo wysoka we wszystkich kombinacjach. Wyjątek stanowiła kombinacja, w której jako zapylacza użyto gorczycę białą (*B. hirta*). W przypadku tej kombinacji nie obserwowano wnikania łagiewek do zalążków.
2. Mieszańce pokolenia F₁ otrzymane poprzez kultury zarodków były w poszczególnych kombinacjach zróżnicowane morfologicznie, ale zawsze w morfotypie formy matecznej. Zróżnicowanie to było szczególnie widoczne w stadium rozety i zanikało w późniejszych stadiach rozwojowych roślin.
3. Barwa okrywy nasiennej u roślin pokolenia F₁ w większości przypadków była typowa dla genotypu matecznego — *B. napus* (czarna). Jednak w niektórych kombinacjach krzyżowań obserwowano segregację na barwę czarną, brązową i żółtą. Przy czym nasiona żółte otrzymano jedynie z krzyżowań *B. napus* z *B. campestris* ssp. *pekinensis* i ssp. *sarson*.

Literatura

- Bell J.M., Shires A. 1982. Composition and digestibility by pigs of hull fractions from rapeseed cultivars with yellow or brown seed coats. *Can. J. Animal Sci.*, 62: 557-565.
- Chen B.Y., Heneen W.K., Jönsson R. 1988. Resynthesis of *Brassica napus* L. through interspecific hybridisation between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with special emphasis on seed colour. *Plant Breeding*, 101: 52-59.
- Deyer A.F. 1936. Lacto-propionic orcein stain. *Stain Technol.*, 38: 85.
- Häkanson A. 1956. Seed development of *Brassica oleracea* and *B. rapa* after certain reciprocal pollinations. *Hereditas*, 42: 373-376.
- Heneen W.K., Brismar K. 2001. Maternal and embryonal control of seed colour by different *Brassica alboglabra* chromosomes. *Plant Breeding*, 120/4: 325-329.
- Jönsson R., Bengtsson L. 1970. Gulfröighet i raps och rybs. I. Inverkan av förädling för gulfröighet podlings – och kvalitetsegenskaper. *Sveriges Utsädesf. Tidskr.*, 80: 149-155.
- Keller W.A., Amstrong K.C. 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther culture. *Can. J. Bot.*, 55/10: 1383-1388.

- Liu Hou-li, Han Ji-xiang, Hu Xiao-jun 1991. Studies on the inheritance of seed coat colour and other related characters of yellow-seeded *Brassica napus*. Proc. 8th Int. Rapeseed Cong., Saskatoon, Canada: 1438-1444.
- Mackiewicz T., Łuczkiwicz T., Wojciechowski A. 1979. Ocena stopnia samoniezgodności u poszczególnych odmian i rodów rzepaku ozimego. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 23 (5): 183-291.
- Martin F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means fluorescence. Stain Technol., 34: 125-128.
- Meng Gan Li, Li Zaiyun, Shi Shuwen 1994. Doubled transfer of yellow-seed genes from *Brassica campestris* and *Brassica carinata* to *B. napus*. Journal of Hanzhong Agricultural University, Sup. Sum., 17: 4.
- Murashige T., Skooga F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. 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: 215-222.
- Nishiyama I., Inomata N. 1966. Embryological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x in *Brassica*. Japan J. Genet., 41: 27-42.
- Nitsh J.P., Nitsh C., Hamon S. 1969. Production de *Nicotiana* diploids a partir de cals haploides cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci. Paris, 269: 1275-1278.
- Ochodzki P., Piotrowska A. 2002. Właściwości fizyczne i skład chemiczny nasion rzepaku ozimego o różnym kolorze okrywy nasiennej. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXIII: 235-242.
- Olsson G. 1960. Species crosses within the genus *Brassica*. II. Artificial *Brassica napus* L. Hereditas, 46: 351-386.
- Rahman M.H. 2001. Production of yellow seed *Brassica napus* through interspecific crosses. Plant Breeding, 120: 463-472.
- Rahman M.H., Joersbo M., Poulsen M.H. 2001. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality. Plant Breeding, 120/6: 473-478.
- Shirzadegan M. 1986. Inheritance of seed colour in *Brassica napus* L. Z. Pflanzenzüchtg., 96: 140-146.
- Shirzadegan M., Röbbelen G. 1985. Influence of seed color and hull proportion on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. Fette Seifen Anstrichmitte'l, 87: 235-237.
- Słominski S.A., Simbaya J., Campbell L.D., Rakow G., Guenter W. 1999. Nutritive value for broiler sof meal derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. Anim. Feed Sci. Technol., 78: 249-262.
- Springer B. 2004. Bariery krzyżowalności w rodzaju *Brassica*. Praca doktorska, AR w Poznaniu.
- Stringam G.R., McGregor D.J., Pawłowski S.H. 1974. Chemical and morfological characteristics associated with seed coat colour in rapeseed. Proc. 4th Int. Rapeseed – Conf. Geissen Germany: 99-108.
- Tang Z.L., Li J.N., Zhang X.K., Chen L., Wang R. 1997. Genetic variation of yellow-seeded rapeseed lines (*Brassica napus* L.) from different genetic sources. Plant Breeding, 116: 471-474.
- Wojciechowski A. 1985a. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. I. Effectiveness of Crossing, Pollen Tube Growth, Embriogenesis. Genetica Polonica, 26/4: 423-436.
- Wojciechowski A. 1985b. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. II. Morphological traits. Somatic chromosome number, Meiotic division and microsporogenesis. Genetica Polonica, 26/4: 437-446.

- Wojciechowski A. 1998. Zdolności regeneracyjne wybranych genotypów *Brassica* w warunkach in vitro. Roczniki Naukowe Akademii Rolniczej w Poznaniu. Z. 289: 1-58.
- Wojciechowski A., Nowak K., Olejniczak J. 1997. Wstępne wyniki krzyżowań międzygatunkowych pomiędzy *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris* i *B. fluticulosa*, Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XVIII: 91-98.