

*Iwona Bartkowiak-Broda, Wiesława Popławska, Małgorzata Górską-Pauksztą,
Beata Gazecka-Michalska, Alina Liersch
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu*

Wyniki badań nad wykorzystaniem CMS*Pol* do hodowli odmian mieszańcowych rzepaku ozimego

W ciągu ostatnich lat jednym z najatrakcyjniejszych zadań w hodowli rzepaku są badania nad uzyskaniem odmian mieszańcowych. Zdecydowały o tym względy ekonomiczne, występowanie znacznego efektu heterozji w plonie nasion oraz odkrycie genetycznych mechanizmów kontrolowania zapylenia krzyżowego, jak genowo-cytoplazmatyczna męska niepełność (CMS) i samoniezgodność.

Niedoskonałości systemów męskiej niepełności jak i samoniezgodności sprawiły, że hodowla odmian mieszańcowych znacznie się wydłużyła.

Najczęściej przedmiotem badań jest CMS*Pol* odkryta przez Fu w 1972 r. (Liu i in. 1987) w populacji jarej, tradycyjnej odmiany Polima. W Zakładzie Roślin Oleistych IHAR badania nad CMS*Pol* rozpoczęto w 1982 r. (Bartkowiak-Broda 1991).

Niestabilność ekspresji męskiej niepełności typu CMS*Pol* oraz niska częstotliwość występowania w gatunku *Brassica napus* genów restorerów dla tego systemu spowodowały, że dla jej wykorzystania do tworzenia odmian mieszańcowych konieczny jest długi proces hodowli linii dopełniających i linii restorujących, jednocześnie posiadających cechy rzepaku podwójnie ulepszanego oraz wykazujących dobrą zdolność kombinacyjną.

Materiał i metodyka

Dotąd w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR do sterylnej cytoplazmy CMS*Pol* poprzez sukcesywne krzyżowanie wsteczne wprowadzono genotyp rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego.

Ponadto spośród kilkuset przebadanych linii i odmian rzepaku wyselekcjonowano:

1. Dwie linie dopełniające rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego PN 410/88 i PN 4315/89, zapewniające uzyskanie w liniach CMS*Pol* ponad 90% termostabilnych roślin męskosterylnych.

2. Źródła genów restorerów:

- linia rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego PN 5297/86 – determinacja przywracania płodności potomstwu linii męskosterylnych przez 2 pary alleli o działaniu addytywnym,
- formy wyselekcjonowane z roślin częściowo męskopłodnych (pMF) – determinacja przez jeden gen dominujący.

Materiały te, jak również tradycyjna jara odmiana Italy, u której w Kanadzie odkryto dominujący gen restorer męskiej płodności dla *CMS_{pol}* (Fang, McVetty 1987), były obiektami prac hodowlanych mających na celu uzyskanie wartościowych komponentów do hodowli odmian mieszańcowych w systemie trójliniowym.

Geny restorery z wymienionych trzech różnych źródeł były wprowadzane do pożądanego genotypu rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego poprzez krzyżowanie bądź z liniami tego typu rzepaku, bądź z męskoniepłodnymi, podwójnie ulepszonymi liniami *CMS_{pol}*. Z obu linii dopełniających poprzez chów wsobny wyprowadzono linie wsobne. Z linii dopełniającej PN 410/88 na drodze androgenezy z kultur pylników wyprowadzono podwojone haploidy (DH). Kultury pylnikowe prowadzono metodą Kellera i in. (1982) zmodyfikowaną przez Nałęczynską (1991). Nasiona pokolenia A_1 w celu rozmnożenia były wysiewane w doniczkach w szklarni. Uzyskane pokolenie A_2 linii DH było testowane w mieszańcach z liniami męskosterylnymi na zdolność do utrzymywania form męskoniepłodnych o stabilnej ekspresji tej cechy przez cały okres kwitnienia.

Obserwacji ekspresji męskiej sterility dokonywano w warunkach szklarniowych i w warunkach polowych. W szklarni obserwacje prowadzono na trzech roślinach z każdej linii, a w polu na 20–30 roślinach z każdej linii.

Efekt heterozji u mieszańców pokolenia F_1 pomiędzy liniami męskosterylnymi i 20 liniami, posiadającymi w swoim genotypie geny restorery pochodzące od linii PN 5297/86, oceniono w doświadczeniu polowym założonym w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych w czterech powtórzeniach.

W testowanych mieszańcach pokolenia F_1 i ich formach rodzicielskich zbadano także zawartość glukozyolanów alkenowych w nasionach według metody Byczyńskiej i Krzymańskiego (1981).

Wyniki i dyskusja

Poprzez sukcesywne krzyżowanie form restorujących i dopełniających z różnymi liniami rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego uzyskano ozime linie dopełniające i restorujące pozbawione kwasu erukowego oraz o bardzo niskiej zawartości glukozyolanów (tab. 1). Zawartość oleju w nasionach w przypadku linii dopełniających oraz linii z genami restorerami pochodzącymi z linii PN 5297/86 odpowiada poziomowi,

jaki obserwuje się u odmian rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. Niektóre linie z genami restorerami wprowadzonymi z form częściowo męskopłodnych (pMF) oraz od odmiany Italy charakteryzują się niską zawartością oleju w nasionach. Cecha niskiej zawartości oleju została wniesiona wraz z genotypem jarej odmiany Italy oraz jarej odmiany Polima, w populacji której wyselekcjonowano rośliny pMF. Podniesienie zawartości oleju w tych liniach jest możliwe poprzez wielokrotne krzyżowanie wsteczne z najlepszymi liniami rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego.

Tabela 1. Charakterystyka linii restorujących i dopełniających CMS*pol*

Linie	Liczba linii	Zawartość oleju [%]			Zaw. kw. eruk. [%]			Suma glukozyolanów [μM/g b.s.m.]		
		\bar{x}	min	max	\bar{x}	min	max	x	min	max
Restorujące										
pMF	18	45,1	36,7	48,7	0,0	0,0	0,2	4,39	0,6	10,8
Italy	21	42,5	34,5	48,2	0,0	0,0	0,3	7,86	2,9	12,2
PN 5297/86	41	48,2	46,1	50,5	0,0	0,0	0,2	3,48	0,2	7,8
Dopełniające										
PN 410/88	37	46,1	44,1	48,1	0,0	0,0	0,3	5,5	0,3	10,3
PN 4315/89	22	48,6	45,5	50,4	0,0	0,0	0,2	4,4	0,7	8,2

Stabilność ekspresji męskiej sterility w różnych warunkach środowiskowych jest warunkiem wykorzystania danego systemu CMS do produkcji nasion mieszańcowych. W przypadku strukturalnych form męskiej niepłodności, jaką jest CMS*pol*, w niektórych warunkach środowiskowych, jak na przykład wysoka temperatura, następuje powrót do częściowej męskiej płodności (Bartkowiak-Broda 1991; Fan, Stefansson 1986). Dlatego dla uzyskania stabilnych linii męskopłodnych niezbędne są linie dopełniające, zawierające w swoim genotypie komplet analogicznych recesywnych genów warunkujących męską niepłodność w stanie homozygotycznym. Wcześniej przeprowadzone obserwacje nad zdolnością do dopełniania CMS*pol* przez linię PN 410/88 wykazały, że w miarę zwiększania jej homozygotyczności poprzez chów wsobny daje ona z liniami męskosterylnymi potomstwo wykazujące większą stabilność ekspresji męskiej niepłodności (Bartkowiak-Broda 1991). W związku z tym na drodze androgenezy wyprowadzono z niej podwojone haploidy. Z przebadanych w mieszańcach testowych z roślinami męskopłodnymi CMS*pol* 33 linii DH (pokolenie A₂) 21 okazało się pełnymi dopełniaczami (tab. 2). Potwierdziły to obserwacje przeprowadzone zarówno w szklarni jak i w polu.

Tabela 2. Zdolność dopełniania CMS*pol* przez podwojone haploidy wyprowadzone z linii PN 410/88

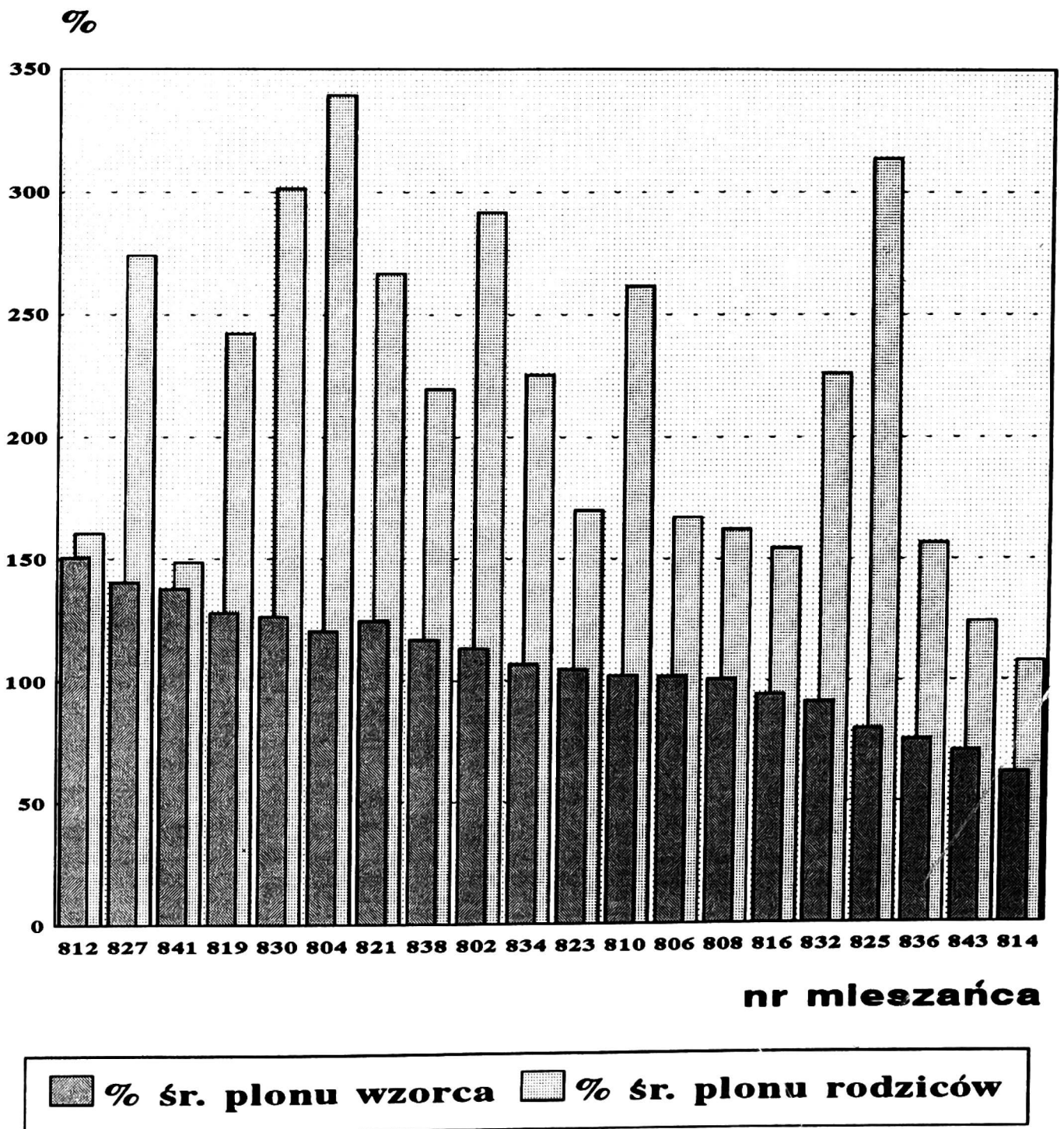
Nr linii DH	Typ roślin otrzymywanych w potomstwie z linią CMS <i>pol</i>
PN 5756/4	MS, pMS
PN 5756/5	MS
PN 5792/1	MS
PN 5793/1	MS
PN 5793/2	MS
PN 5793/6	MS
PN 5793/7	MS, pMS
PN 5793/10	MS
PN 5794/3	MS
PN 5794/4	MS
PN 5794/6	MS, pMS
PN 5794/7	MS, pMS
PN 5794/8	MS
PN 5794/9	MS, pMS
PN 5794/11	MS
PN 5794/13	MS
PN 5794/15	MS, pMS
PN 5795/1	MS, pMF
PN 5795/4	MS, pMS, pMF
PN 5796/1	MS, pMS
PN 5796/3	MS
PN 5796/4	MS, pMS, pMF
PN 5796/6	MS
PN 5796/7	MS
PN 5756/9	MS
PN 5756/15	MS
PN 5797/8	MS, pMF
PN 5797/10	MS
PN 5797/11	MS
PN 5797/12	MS
PN 5797/13	MS
PN 5797/14	MS
PN 5797/15	MS, pMF

MS – rośliny męskosterylne,

pMS – rośliny częściowo męskosterylne,

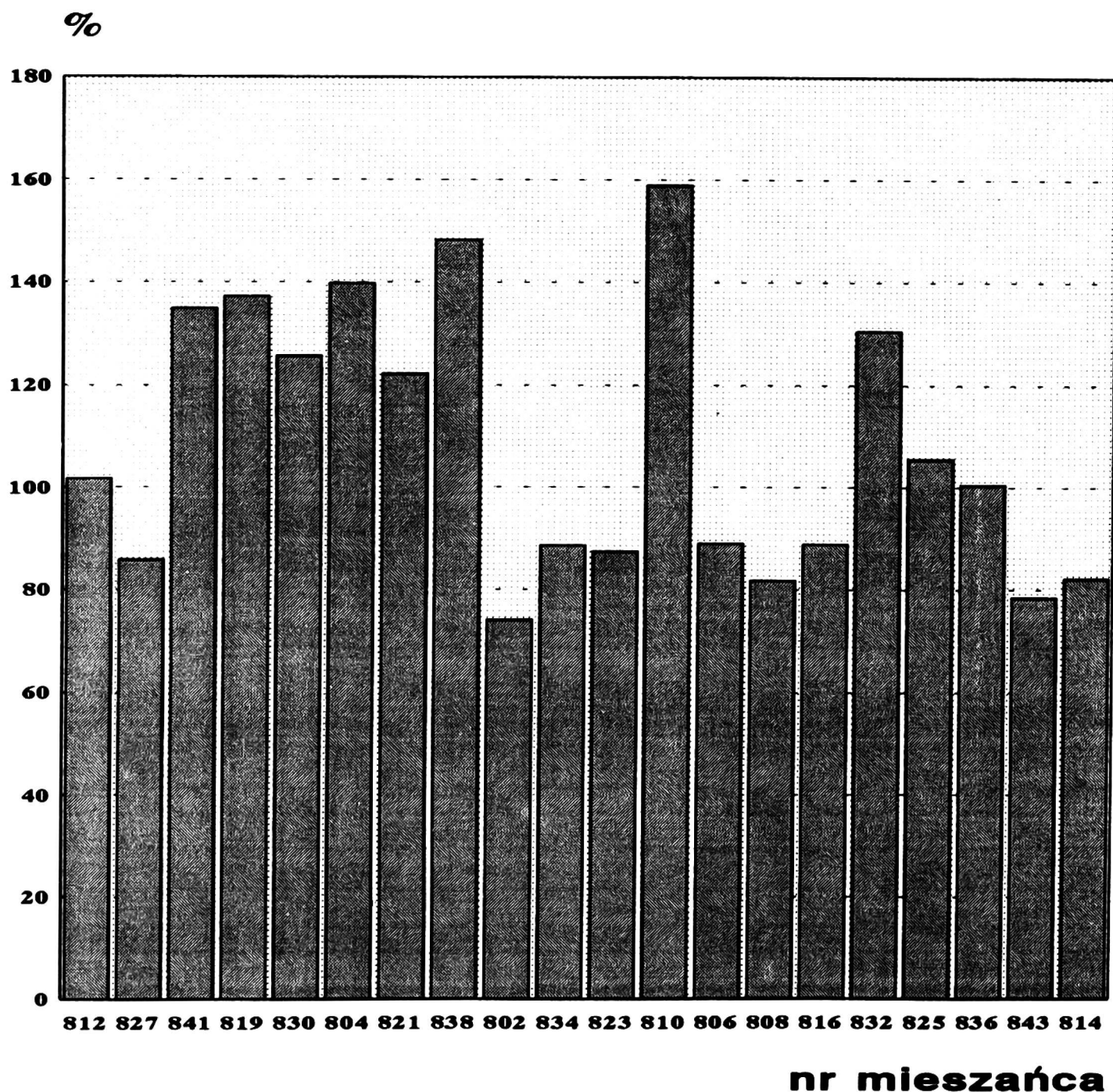
pMF – rośliny częściowo męskopłodne.

Obserwacje polowe wykazały, że wigor linii podwojonych haploidów był znacznie niższy niż wigor linii wyjściowych. Wynik ten jednak nie przesądza o niemożności wyprowadzenia z posiadanej linii dopełniającej podwojonych haploidów o dobrym wigorze. Dla uzyskania z danego genotypu wartościowych podwojonych haploidów konieczne jest wyprowadzenie dużej liczby linii DH (Nałęczńska 1991).



Wykres 1. Plon mieszańców pokolenia F₁ w porównaniu do plonu rodu wzorcowego oraz średniej plonu rodziców

Próbne mieszańce pokolenia F_1 20 różnych podwójnie ulepszonych linii restorujących z liniami mękosterylnymi wykazały efekt heterozji mierzony w stosunku do średniego plonu form rodzicielskich w zakresie od 8% do 239% (wyk. 1). Powyżej średniego plonu wzorcowego rodu podwójnie ulepszanego w doświadczeniu plono wało 14 mieszańców. Plon ich wahał się w zakresie od 100,7% do 150,5% plonu wzorca. Te wstępne wyniki wskazują na możliwość wyselekcjonowania komponentów dających mieszańce o znacznym efekcie heterozji.



Wykres 2. Zawartość glukozyolanów alkenowych w nasionach mieszańców pokolenia F_1 w porównaniu do średniej rodziców

Wyniki badań dotyczące oceny wartości sterylnej cytoplazmy pochodzącej od *CMSpol* są kontrowersyjne. Wiadomo, że procesy metaboliczne jak i szybkość ich zachodzenia w sterylnej cytoplazmie są upośledzone, co wpływa ujemnie na wielkość uzyskiwanego efektu heterozji. Przy czym ten negatywny wpływ sterylnej cytoplazmy może być różny w zależności od pochodzenia form CMS, jak również od wprowadzonego do danej cytoplazmy genotypu. Badania przeprowadzone w Kanadzie przez McVetty, Scarth i Rimmera (1991) wykazały, że sterylna cytoplazma typu *polima* w wyższym stopniu wpływa na obniżenie poziomu plonowania mieszańców niż sterylna cytoplazma typu *napus*. Przy czym stwierdzono, że różne genotypy wykazują różny poziom tolerancji na cytoplazmę *polima* i istnieje możliwość selekcji takich komponentów mieszańców, gdzie biologiczny koszt związany z męskosterylną cytoplazmą będzie stosunkowo niski.

U testowanych mieszańców pokolenia F_1 stwierdzono efekt heterozji w zawartości glukozyolanów alkenowych w nasionach w porównaniu do średniej zawartości u ich form rodzicielskich (wyk. 2). Zwyżka zawartości glukozyolanów nie wystąpiła u wszystkich mieszańców, jednak zawsze u tych, które wykazały wysoki efekt heterozji w plonie nasion. Najwyższy efekt heterozji w zawartości glukozyolanów u badanych mieszańców wyniósł 59%.

Wynik ten wskazuje na konieczność bardzo ostrej selekcji komponentów mieszańców pod względem zawartości glukozyolanów w nasionach. Można się bowiem spodziewać, że w mieszańcach, u których wystąpi wysoki efekt heterozji w plonie nasion, będzie on także wysoki w zawartości glukozyolanów alkenowych.

Wnioski

Geny restorujące i dopełniające *CMSpol* wprowadzono do genotypu rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego.

Wyprowadzone z linii dopełniającej PN 410/88 podwojone haploidy zapewniają lepszą stabilność ekspresji męskiej sterylności *CMSpol*.

Przebadane mieszańce testowe wykazały zróżnicowany efekt heterozji w plonie nasion, wskazujący na możliwość selekcji kombinacji znacznie przewyższających plennością odmiany standardowe.

W niektórych kombinacjach wykazujących wysoki efekt heterozji w plonie nasion, stwierdzono także znaczny efekt heterozji w zawartości glukozyolanów alkenowych.

- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej niepłodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. *oleifera*. *Hod. Roś. Aklim. i Nas.* 35 (3/4): 3-60.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1981. Ulepszona metoda ekstrakcji i oznaczania glukozyolanów w nasionach rzepaku. *Biul. IHAR* 146: 95-99.
- Fan Z., Stefansson B. R. 1986. Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Plant Sci.* 66: 229-234.
- Fang G. H., McVetty P. B. E. 1987. Inheritance of male sterility restoration for the Polima CMS system in *Brassica napus* L. Proc. 7 th Int. Rapeseed Congress, 11-14 May. Poznań, Poland. Vol.1: 73-78
- Keller W. A., Armstrong K. C., de la Roche A. I. 1982. The production and utilization of microspores-derived haploids in *Brassica* crops. In: Plant Cell Culture in Crop Improvement K. L. Giles and S. K. Sen. Plenum Pub. Corp. New York. 169-183.
- Liu H. L., Fu T. D., Yang S. N. 1987. Discovery and studies on Polima CMS line. Proc. 7 th Int. Rapeseed Congress, 11-14 May. Poznań, Poland. Vol.1: 69-72.
- McVetty P. B. E., Scarth R., Rimmer S. R. 1991. Hybrid canola breeding at the University of Manitoba. Proc. 8 th Int. Rapeseed Congress, 9-11 July. Saskatoon, Kanada. Vol.1: 76-81.
- Nałęczńska A. 1991. Zastosowanie podwojonych haploidów w hodowli rzepaku. Część I. Otrzymywanie homozygotycznych linii. *Hod. Roś. Aklim. i Nas.* 35 (1/2): 3-28.

Results of investigations on possibility of CMS_{Pol} utilization for winter rapeseed hybrid varieties development

Summary

The factor limiting the possibility of utilization of CMS_{Pol} for hybrid seeds production is the instability of male sterility expression. This stability has been improved by increasing of homozygosity of maintaining lines. It has been achieved by inbreeding as well as by production of doubled haploids from maintainers and their several backcrossings with CMS_{Pol} lines.

The restorer genes originating from three sources: variety Italy, partially male fertile plants of CMS_{Pol} and double low line of winter oilseed rape PN 5297/86, have been introduced to genotype of different double low lines of winter oilseed rape.

Some of them were tested in hybrids with CMS_{Pol} lines in field trial and revealed heterosis effect, measured in comparison to the parents mean yield, ranged from 8 to 239 per cent. Several combinations yielded over the standard double low line in range from 0.7 to 50.5 per cent.

In some investigated hybrids high heterosis effect in alkenyl glucosinolate content has been found.