

Błażej Springer, Andrzej Wojciechowski, Przemysław Wiąz

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

## Określenie efektywności i stopnia zgodności w krzyżowaniach oddalonych rzepaku jarego *B. napus* var. *oleifera* f. *annua* (CMS) z wybranymi gatunkami *Brassica* o jasnej okrywie nasiennej

The assessment of effectiveness and crossing compatibility in wide hybridization of *B. napus* var. *oleifera* f. *annua* (CMS) with yellow seeded *Brassica* species

Słowa kluczowe: rzepak jary, *Brassica napus* L., barwa nasion, krzyżowanie oddalone

W prezentowanej pracy oceniano zgodność krzyżową w krzyżowaniach międzygatunkowych męskosterylnej formy rzepaku jarego *B. napus* var. *oleifera* f. *annua* ( $2n = AACC = 38$ ) z gatunkami diploidalnymi i amfidiploidalnymi *Brassica* o żółtej i brązowej okrywie nasiennej. Do krzyżowań z *B. napus* wykorzystano 10 genotypów *B. rapa* ( $2n = AA = 20$ ), 16 genotypów *B. juncea* ( $2n = AABB = 36$ ) oraz po jednym genotypie *B. carinata* ( $2n = BBCC = 34$ ) i *B. fruticulosa* ( $2n = FF = 16$ ). Krzyżowanie wyżej wymienionych gatunków z *B. napus* użytą jako komponent mateczny wykonano w szklarni. Do oceny zgodności krzyżowej wykonano obserwacje kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych oraz wiązania nasion w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych. We wszystkich wykonanych kombinacjach krzyżówkowych obserwowano wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążków. Zgodność kojarzeniowa obserwowana na podstawie wnikania łagiewek pyłkowych znalazła odzwierciedlenie w wiązaniu nasion, które również otrzymano we wszystkich kombinacjach.

Key words: spring oilseed rape, *Brassica napus* L., seed colour, wide hybridization

The crossability in interspecific crosses of spring rapeseed MS line of *B. napus* var. *oleifera* f. *annua* ( $2n = AACC = 38$ ) with yellow or brown seeded diploid and amphidiploid *Brassica* species, i.e.; 10 genotypes of *B. rapa* ( $2n = AA = 20$ ), 16 genotypes of *B. juncea* ( $2n = AABB = 36$ ) and 1 genotype of *B. carinata* ( $2n = BBCC = 34$ ) and *B. fruticulosa* ( $2n = FF = 16$ ) was investigated and the results are presented in this paper. The crosses of above mentioned species with *B. napus* used as female parent were done in greenhouse conditions. The crossability of used species was evaluated and based on the observation of pollen tubes growth and seed set in particular cross combinations. The penetration of pollen tubes into the ovules was observed in all cross combinations. Although cross compatibility was different in particular crosses, seed set was observed in all combinations.

## Wstęp

---

Do rodzaju *Brassica* należy 41 gatunków (Gładis i Hammer 1992), z czego dużą wartość gospodarczą posiada sześć z nich. Są to *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleracea* i *B. rapa*. Gatunki te charakteryzują się wysoką zawartością oleju w nasionach, która u form uprawnych dochodzi do 50%.

W naszej strefie klimatycznej rzepak (*B. napus* var. *oleifera*) jest najczęściej uprawianą rośliną oleistą. Znaczenie tej uprawy tak w Polsce, jak i na świecie rośnie z roku na rok (Bartkowiak-Broda i Mikołajczyk 2003). W Polsce zasiewy rzepaku stanowią około 97% obszaru przeznaczzonego pod uprawę roślin oleistych. Ponadto powierzchnia uprawy rzepaku w Polsce rośnie sukcesywnie i w ostatnich latach wynosiła ok. 550–600 tys. ha. Na przeważającej powierzchni uprawiana jest forma ozima rzepaku, natomiast powierzchnia uprawy rzepaku jarego waha się znacznie w latach i wynosi od kilku do kilkudziesięciu tys. ha. Pomimo, że rzepak jary przegrywa w konkurencji z rzepakiem ozimym, to jednak nie należy zaniedbywać prac hodowlanych nad tą formą, gdyż w latach o ostrych zimach może ona stać się jedyną alternatywą dla rolników i przemysłu tłuszczowego.

Rosnące zapotrzebowanie i coraz większe wymagania stawiane nasionom rzepaku stanowią nowe wyzwania dla hodowli tego gatunku. By sprostać rosnącym oczekiwaniom rynku, w badaniach nad rzepakiem na szeroką skalę stosuje się krzyżowania międzygatunkowe i międzyrodzajowe, które mają na celu poszerzenie dosyć wąskiej u tego gatunku różnorodności genetycznej (Kräling 1987). Jednym z istotniejszych problemów w hodowli rzepaku jest zmiana barwy nasion. Jasna barwa nasion jest cechą pożądaną u *B. napus*, gdyż jest powiązana ze spadkiem udziału okrywy nasiennej w nasieniu. Czarne nasiona odznaczają się grubszą okrywą w stosunku do nasion żółtych. Nasiona żółte charakteryzują się także podwyższoną zawartością tłuszczu i białka, a obniżoną zawartością włókna (Stringam i in. 1974). *B. napus* jest gatunkiem, u którego w naturze nie występują nasiona żółte (Liu i in. 1991), stąd też wydaje się, że jednym z głównych sposobów introgresji tej cechy do rzepaku jest krzyżowanie oddalone z gatunkami spokrewnionymi o żółtej lub brązowej barwie nasion (Zaman 1988). Począwszy od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku w katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu prowadzone są krzyżowania oddalone rzepaku ozimego i jarego, których celem jest wybór możliwie najbardziej zgodnych kombinacji krzyżówkowych umożliwiających otrzymanie szerokiej zmienności genetycznej u mieszańców oddalonych.

Celem niniejszych badań była ocena zgodności krzyżowej oraz efektywności krzyżowań i barier krzyżowalności w krzyżowaniach oddalonych rzepaku jarego z wybranymi genotypami czterech gatunków *Brassica* o żółtej i brązowej barwie nasion.

## Material i metody

Formą mateczną użytą do krzyżowań był rzepak jary (*Brassica napus* (L.) var. *oleifera* (Metzg.) f. *annua*) ( $2n = 4x = \text{AACC} = 38$ ); posiadający cechę męskiej sterylności typu Ogura. Formy ojcowskie stanowiły żółto- lub brązowonasienne formy należące do gatunków:

- *Brassica carinata* (A. Braun) — gorczyca etiopska ( $2n = 4x = \text{BBCC} = 34$ )  
materiał uzyskano z Institute for Agrobotany, Tapioszele, Węgry;
- *Brassica juncea* (L.) — gorczyca sarepska ( $2n = 4x = \text{AABB} = 36$ )  
materiał otrzymano z banku genów IPK Genebank, Gatersleben, Niemcy;
- *Brassica rapa* (L.) syn. *Brassica campestris* ssp. *oleifera* (L.)  
— rzepik jary ( $2n = 2x = \text{AA} = 20$ )  
materiał otrzymano z banku genów IPK Genebank, Gatersleben, Niemcy;
- *Brassica fruticulosa* (Cyr.) — ( $2n = 2x = \text{FF} = 16$ )  
materiał uzyskano z Institute for Agrobotany, Tapioszele, Węgry.

Doświadczenie założono w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu. Jednokierunkowe, kontrolowane krzyżowania komponentów rodzicielskich w układzie, w którym forma MS *B. napus* została użyta jako forma mateczna przeprowadzono w okresie wiosennym, od kwietnia do czerwca 2006. W trakcie całego doświadczenia wykonano prace obejmujące następujące zagadnienia:

- 1) ocenę zgodności krzyżowej na podstawie obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka,
- 2) efektywność krzyżowań materiałów użytych w doświadczeniu.

Obserwacje kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych wykonano przy zastosowaniu techniki fluoroscencyjnej. Z każdej kombinacji krzyżówkowej pobrano po 4 słupki po upływie odpowiednio 12, 24 i 48 godzin od momentu zapylenia. Pobrane słupki utrwalano w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoy'a (6:3:1; EOH 95%: chloroform:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) przez 24 godziny. Po utrwaleniu materiał przechowywano w 70% alkoholu. Preparaty wykonano według metody zaproponowanej przez Martina (1959) w modyfikacji Wojciechowskiego (1985).

Przy oznaczeniu stopnia kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu i wnikania łagiewek pyłkowych w dalsze części słupka posłużono się umowną pięciostopniową skalą, w której:

- 0 – oznacza brak łagiewek,
- 1 – pojedyncze łagiewki,
- 2 – nieliczne łagiewki,
- 3 – liczne łagiewki,
- 4 – bardzo liczne łagiewki.

Efektywność krzyżowań wyrażono:

- liczbą zawiązanych łuszczyń w stosunku do liczby zapylnych kwiatów,
- współczynnikiem efektywności krzyżowania (WEK), który obliczono jako stosunek liczby normalnie wykształconych nasion do liczby zapylnych kwiatów,
- procentem prawidłowo wykształconych nasion.

## Wyniki

---

### Ocena zgodności krzyżowej na podstawie stopnia kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych w poszczególnych częściach słupka

Wyniki obserwacji łagiewek pyłkowych zamieszczono w tabeli 1. W każdej z wykonanych kombinacji krzyżówkowych obserwowano łagiewki pyłkowe we wszystkich częściach słupka. Ponadto, w każdej kombinacji udało się uchwycić moment wnikania łagiewki do zalążka.

Najintensywniejsze kiełkowanie ziaren pyłku na znamieniu obserwowano po 12 godzinach od zapylenia w większości kombinacji krzyżowań. Najszybsze tempo wzrostu łagiewek pyłkowych obserwowano w kombinacjach, gdzie jako zapylaczy użyto poszczególnych genotypów *B. juncea*, u większości których łagiewki pyłkowe docierały do zalążni już po 12 godzinach. W trzech kombinacjach: *B. napus* × *B. juncea* CR 2514/93a, CR 2609/87 i CR 2657/84 obserwowano po tym czasie także pojedyncze łagiewki wnikające w mikropyle. Łagiewki w zalążni po 12 godzinach od zapylenia obserwowano także w kombinacjach *B. napus* × *B. carinata* RCAT 067293, *B. napus* × *B. fruticulosa* RCAT 062227 i w przypadku jednej kombinacji z *B. rapa*: *B. napus* × *B. rapa* CR 1643/98. W przypadku zapylenia kontrolnego (*B. napus* CMS × *B. napus*) po 12 godzinach od krzyżowania obserwowano liczne łagiewki pyłkowe na znamieniu i w szyjce słupka, natomiast nie docierały one jeszcze do zalążni.

Po 24 godzinach od momentu zapylenia we wszystkich wariantach krzyżowań za wyjątkiem kombinacji *B. napus* × *B. rapa* CR 2925/79 obserwowano łagiewki pyłkowe wnikające w mikropyle i stosunkowo liczne łagiewki pyłkowe znajdujące się w szyjce słupka, zalążni i przy zalążkach. W obrębie krzyżowań, gdzie jako zapylaczy dla *B. napus* użyto genotypów *B. rapa* najintensywniejsze wnikanie łagiewek pyłkowych do zalążka po 24 h od zapylenia obserwowano w obrębie kombinacji *B. napus* × *B. rapa* CR 2286/01 (2,5 w pięciostopniowej skali), a najslabsze w kombinacji *B. napus* × *B. rapa* CR 2925/79 (0,0).

Spośród krzyżowań pomiędzy *B. napus* a *B. juncea* po 24 h od zapylenia najwięcej łagiewek wnikających do zalążków obserwowano w kombinacji *B. napus* × *B. juncea* CR 2436/82 (3,3), a najmniej w kombinacji *B. napus* × *B. juncea* CR 2486/88 (1,3) (tab. 1).

Tabela 1

Kielkowanie ziaren pyłku i stopień wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka w krzyżowaniach oddalonych *B. napus* z czterema innymi gatunkami *Brassica*  
*Pollen grains germination and penetration of pollen tubes into particular parts of style in interspecific crossings of B. napus with four other Brassica species*

Kombinacja krzyżowania <i>Cross combination</i> Genotyp <i>Genotype</i>	Czas po zapyleniu [h] <i>Time after pollination</i>	Stopień przenikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka* — <i>Penetration of pistil by pollen tubes</i>			
		znamię <i>stigma</i>	szyjka <i>style</i>	założnia <i>ovule</i>	wnikanie do założka <i>penetration into ovules</i>
1	2	3	4	5	6
<i>Brassica napus f. annua (CMS) × Brassica napus f. annua</i>					
<i>Brassica napus f. annua</i> PAU CP 205 [kontrola]	12	4,0	3,0	0	0
	24	4,0	3,8	4,0	4,0
	48	2,8	4,0	3,8	3,8
<i>Brassica napus f. annua (CMS) × Brassica rapa</i>					
Indus ECN 1500400028	12	4,0	0,3	0	0
	24	3,3	1,3	2,0	1,3
	48	1,5	1,8	3,0	3,3
CR 1643/98	12	3,8	2,0	0,3	0
	24	2,0	3,3	3,0	2,3
	48	0,3	1,0	1,5	1,3
CR 2217/01	12	4,0	1,0	0	0
	24	2,5	1,5	2,0	0,8
	48	0,3	0,3	2,3	2,5
CR 2220/93a	12	2,3	0	0	0
	24	1,3	2,0	2,8	2,0
	48	0,5	1,0	2,0	2,3
CR 2244/01	12	3,5	0,8	0	0
	24	0,8	1,0	0,8	0,3
	48	0,5	1,5	1,5	1,3
CR 2286/01	12	2,3	0,5	0	0
	24	1,0	1,0	2,8	2,5
	48	1,0	1,0	2,0	2,3
CR 2344/98	12	3,0	2,5	0	0
	24	2,0	1,8	2,5	2,0
	48	1,0	1,3	2,5	3,0
CR 2348/99	12	4,0	1,7	0	0
	24	2,7	2,0	1,7	1,0
	48	0,8	1,0	2,0	1,8
CR 2916/82	12	3,8	2,3	0	0
	24	2,0	3,3	2,3	1,3
	48	1,5	1,0	2,3	2,3
CR 2925/79	12	2,0	1,0	0	0
	24	2,8	3,5	0,5	0
	48	2,5	2,5	3,3	3,8

ciąg dalszy tabeli 1

1	2	3	4	5	6
<i>Brassica napus f. annua (CMS) × B. juncea</i>					
CR 94/99	12	3,5	0,3	0	0
	24	1,0	1,0	3,0	2,3
	48	1,3	3,0	3,5	2,5
CR 99/99	12	4,0	4,0	0,8	0
	24	2,8	2,5	3,5	2,3
	48	1,3	1,8	2,8	1,5
CR 102/96	12	4,0	4,0	0,5	0
	24	3,3	3,3	4,0	2,3
	48	3,0	3,0	3,0	1,3
CR 112/02	12	4,0	3,8	0,5	0
	24	3,5	3,5	3,3	2,3
	48	0	1,5	3,8	2,8
CR 2436/82	12	4,0	0,5	0	0
	24	1,8	0,8	2,8	3,3
	48	1,0	1,0	2,8	1,3
CR 2486/88	12	4,0	3,8	0,5	0
	24	4,0	4,0	2,3	1,3
	48	1,0	1,3	1,5	0,5
CR 2506/88	12	4,0	4,0	0,8	0
	24	3,3	3,3	3,0	2,8
	48	2,8	1,3	2,0	1,3
CR 2514/93a	12	3,5	3,5	1,3	1,0
	24	2,3	1,3	3,0	3,0
	48	1,3	1,0	2,0	1,8
CR 2609/87	12	4,0	3,3	0,8	0,3
	24	2,8	3,0	4,0	2,8
	48	1,5	2,0	3,3	2,5
CR 2629/84	12	4,0	4,0	1,0	0
	24	3,0	3,3	3,8	2,8
	48	0,5	1,3	3,3	2,5
CR 2632/87	12	4,0	4,0	1,3	0
	24	3,0	4,0	3,5	2,0
CR 2634/84	12	3,5	4,0	0,8	0
	24	1,8	2,5	3,5	3,0
	48	0,5	1,8	3,0	3,5
CR 2657/84	12	4,0	4,0	1,0	0,3
	24	1,3	1,3	2,8	2,0
	48	0,3	0,8	3,0	2,5
CR 2689/88	12	4,0	2,3	1,0	0
	24	3,3	2,3	2,8	1,5
	48	1,5	1,5	2,3	1,0

ciąg dalszy tabeli 1

1	2	3	4	5	6
<i>Brassica napus</i> f. <i>annua</i> (CMS) × <i>B. carinata</i>					
RCAT 067293	12	1,8	2,5	0,3	0
	24	0,8	2,8	3,0	2,3
	48	1,5	2,0	3,5	3,5
<i>Brassica napus</i> f. <i>annua</i> (CMS) × <i>B. fruticulosa</i>					
RCAT 062227	12	3,0	3,3	0,3	0
	24	3,5	3,8	3,3	1,3
	48	1,0	2,3	2,3	1,7

Liczba obserwowanych ziaren pyłku kielkujących na znamieniu i łagiewek znajdujących się w tkance szyjki słupka, malała wyraźnie we wszystkich kombinacjach po 48 godzinach od zapylenia (w stosunku do ich liczby obserwowanej po 12 godzinach od zapylenia). Nadal jednak we wszystkich kombinacjach krzyżówkowych obserwowano łagiewki pyłkowe znajdujące się w załączni i wnikaące do załączków. Największą liczbę łagiewek wnikaących do załączków po 48 h obserwowano w zapyłaniu kontrolnym: *B. napus* CMS × *B. napus* (Pau CP205) (3,8) oraz w krzyżowaniach *B. napus* × *B. rapa* CR 2925/79 (3,8), najmniejszą natomiast w kombinacji *B. napus* × *B. juncea* CR 2486/88 (0,5).

### Ocena zgodności krzyżowej na podstawie stopnia wiązania nasion

W trakcie całego cyklu doświadczeń dokonano kontrolowanego zapylenia 4176 kwiatów męskosterylnej formy rzepaku jarego Olindigo CMS komponentami ojcowskimi (tab. 2). Uzyskano 3233 łuszczyzny, co stanowi 77,42% zapylnych kwiatów.

Najwyższą liczbą zawiązanych łuszczyzn w stosunku do liczby zapylnych kwiatów charakteryzowała się kombinacja *B. napus* × *B. carinata* (96,55%). Nieco słabiej łuszczyzny wiązały kombinacje, w których zapyłaczami były *B. juncea* (86,76%) i *B. fruticulosa* (83,91%). Najmniejszą liczbę zawiązanych łuszczyzn obserwowano w kombinacjach z *B. rapa* (średnio 62,86% zapylnych kwiatów).

Efektywność krzyżowań oddalonych z uwzględnieniem poszczególnych genotypów czterech gatunków *Brassica*, które użyto do krzyżowań z *B. napus*, przedstawia tabela 2. Najwyższą liczbę zawiązanych łuszczyzn w stosunku do ilości zapylnych kwiatów w całym doświadczeniu odnotowano w kombinacji *B. napus* × *B. juncea* CR 2609/87 (97,81%), a najniższą w *B. napus* × *B. rapa* CR 1643/98 (39,64%).

Tabela 2

Efektywność krzyżowań oddalonych *B. napus* z poszczególnymi genotypami czterech gatunków *Brassica* użytymi w doświadczeniu wyrażona współczynnikiem efektywności krzyżowań (WEK) oraz średnią liczbą nasion w łuszczyńce — *Effectiveness of wide hybridization of B. napus with other Brassica species expressed by crossability coefficient (WEK) and mean seed no. / siliqua*

Kombinacja krzyżowania <i>Cross combination</i>	Płodność — <i>Fertility</i>			Liczba prawidłowych nasion [D] <i>Number of well developed seeds</i>	WEK [D/K]	Średnia liczba nasion w łuszczyńce <i>Seed set per siliqua (mean)</i>
	liczba zapylonych kwiatów <i>No of pollinated flowers [K]</i>	liczba łuszczyń <i>No of siliqua [L]</i>	L/K [%]			
1	2	3	4	5	6	7
<i>Brassica napus × Brassica rapa</i>						
Indus ECN 1500400028	196	161	82,14	2662	13,58	16,53
CR 1643/98	222	88	39,64	997	4,49	11,33
CR 2217/01	122	85	69,67	544	4,46	6,40
CR 2220/93a	118	74	62,71	466	3,95	6,30
CR 2244/01	169	100	59,17	1167	6,91	11,67
CR 2286/01	168	91	54,17	198	1,18	2,18
CR 2344/98	135	78	57,78	546	4,04	7,00
CR 2348/99	156	112	71,79	728	4,67	6,50
CR 2916/82	199	118	59,3	843	4,24	7,14
CR 2925/79	179	139	77,65	361	2,02	2,60
Średnio <i>Mean</i>	1664	1046	62,86	8512	5,12	8,14
<i>Brassica napus × Brassica juncea</i>						
CR 94/99	160	134	83,75	131	0,82	0,98
CR 99/99	91	68	74,73	69	0,76	1,01
CR 102/96	217	165	76,04	80	0,37	0,48
CR 112/02	124	120	96,77	125	1,01	1,04
CR 2436/82	124	118	95,16	123	0,99	1,04
CR 2486/88	169	156	92,31	135	0,8	0,87
CR 2506/88	88	69	78,41	95	1,08	1,38
CR 2514/93a	176	147	83,52	1940	11,02	13,20
CR 2609/87	137	134	97,81	104	0,76	0,78
CR 2629/84	181	174	96,13	106	0,59	0,61
CR 2632/87	157	143	91,08	136	0,87	0,95
CR 2634/84	194	168	86,6	151	0,78	0,90
CR 2657/84	195	160	82,05	78	0,4	0,49
CR 2689/88	124	98	79,03	92	0,74	0,94
Średnio <i>Mean</i>	2137	1854	86,76	3365	1,57	1,81



ciąg dalszy tabeli 2

1	2	3	4	5	6	7
<i>Brassica napus</i> × <i>Brassica carinata</i>						
RCAT 067293	145	140	96,55	23	0,16	0,18
<i>Brassica napus</i> × <i>Brassica fruticulosa</i>						
RCAT 62227	230	193	83,91	5	0,02	0,03

WEK — współczynnik efektywności krzyżowania — *coefficient of crossability*

Zaobserwowano duże zróżnicowanie zarówno pomiędzy gatunkami, jak i pomiędzy poszczególnymi genotypami w obrębie tych samych gatunków odnośnie wartości współczynnika efektywności krzyżowania (WEK). Kombinacje, w których jako zapylaczy użyto poszczególnych genotypów *B. rapa* odznaczały się zdecydowanie najwyższym współczynnikiem efektywności krzyżowań (5,12). Znacznie niższy WEK uzyskano w kombinacjach, gdzie jako zapylaczy użyto *B. juncea* (1,57), *B. carinata* (0,16) i *B. fruticulosa* (0,02). W krzyżowaniach pomiędzy *B. napus* i *B. rapa* rozpiętość WEK wyniosła od 1,18 (kombinacja *B. napus* × *B. rapa* CR 2286/01) do 13,58 (kombinacja *B. napus* × *B. rapa* var. Indus). W krzyżowaniach pomiędzy *B. napus* i *B. juncea*, 13 spośród 14 użytych genotypów nie osiągnęło nawet najniższej wartości uzyskanej w którejkolwiek z kombinacji z *B. rapa*. Na tym tle wyjątkiem jest kombinacja *B. napus* × *B. juncea* CR 2514/93a, dla której wartość WEK (11,02) wypadła znacznie powyżej średniej uzyskanych dla kombinacji z *B. rapa* (5,12), (tab. 2). Najniższą wartość WEK odnotowano w kombinacji *B. napus* × *B. fruticulosa* RCAT 062227, gdzie na 230 zapylonych kwiatów otrzymano zaledwie 5 normalnie wykształconych nasion — wartość WEK — 0,02.

Z wszystkich krzyżowań *B. napus* × *B. rapa* otrzymano dorodne nasiona, które stanowiły 91,79% ogólnej liczby nasion. W krzyżowaniach tych najwięcej normalnych nasion obserwowano w kombinacji *B. napus* × *B. rapa* var. Indus (97,62%), a najmniej w kombinacji *B. napus* × *B. rapa* CR 2916/82 (74,40%), (tab. 3). Znacznie niższy procent prawidłowo wykształconych nasion obserwowano w kombinacjach z *B. juncea* (16,84%). Wyjątkiem była tu jedna kombinacja krzyżówkowa *B. napus* × *B. juncea* CR 2514/93a, gdzie udział nasion dorodnych wyniósł 98,48%. Najniższy udział nasion prawidłowo wykształconych uzyskano z kombinacji *B. napus* × *B. juncea* CR 102/96 (3,74%) i *B. napus* × *B. juncea* CR 2629/84 (4,94%). W kombinacji *B. napus* × *B. carinata* RCAT 0627293 udział nasion prawidłowo wykształconych był stosunkowo wysoki (74,19%), ale uzyskano tu tylko 23 nasiona.

Jeszcze mniej prawidłowo wykształconych nasion uzyskano w kombinacji *B. napus* × *B. fruticulosa* RCAT 062227 — tylko 5 sztuk (27,78%).

Tabela 3

Charakterystyka nasion powstałych w wyniku krzyżowań oddalonych *B. napus* z poszczególnymi genotypami czterech gatunków *Brassica* — *Characteristics of seed development from interspecific crosses of B. napus with particular genotypes of four Brassica species*

Kombinacja krzyżowania <i>Cross combination</i>	Stopień wykształcenia nasion <i>Development of seeds</i>			Procentowy udział nasion dorodnych <i>Percentage of well developed seeds</i>
	normalne <i>well developed</i> [N]	pośląd <i>poor seeds</i>	ogółem <i>total</i> [T]	
<i>Brassica napus</i> (CMS) × <i>Brassica rapa</i>				
Indus ECN 1500400028	2662	65	2727	97,62
CR 1643/98	997	63	1060	94,06
CR 2217/01	544	30	574	94,77
CR 2220/93a	466	42	508	91,73
CR 2244/01	1167	60	1227	95,11
CR 2286/01	198	16	214	92,52
CR 2344/98	546	45	591	92,39
CR 2348/99	728	106	834	87,29
CR 2916/82	843	290	1133	74,40
CR 2925/79	361	44	405	89,14
Ogółem — <i>Total</i>	8512	761	9273	91,79
<i>Brassica napus</i> (CMS) × <i>Brassica juncea</i>				
CR 94/99	131	986	1117	11,73
CR 99/99	69	463	532	12,97
CR 102/96	80	2060	2140	3,74
CR 112/02	125	955	1080	11,57
CR 2436/82	123	1539	1661	7,41
CR 2486/88	135	1292	1427	9,46
CR 2506/88	95	910	1005	9,45
CR 2514/93a	1940	30	1970	98,48
CR 2609/87	104	1055	1159	8,97
CR 2629/84	106	2039	2145	4,94
CR 2632/87	136	1592	1728	7,87
CR 2634/84	151	1435	1586	9,52
CR 2657/84	78	1357	1435	5,44
CR 2689/88	92	911	1003	9,17
Ogółem — <i>Total</i>	3365	16624	19988	16,84
<i>Brassica napus</i> (CMS) × <i>Brassica carinata</i>				
RCAT O67293	23	8	31	74,19
<i>Brassica napus</i> (CMS) × <i>Brassica fruticulosa</i>				
RCAT 62227	5	13	18	27,78

## Dyskusja

Badania nad krzyżowaniem oddalonym w rodzaju *Brassica* zapoczątkowali Karpechenko (1924) i japoński badacz U (1935), który w wyniku krzyżowania *B. rapa* z *B. oleracea* zesynetyzował rzepak — *B. napus* i określił pokrewieństwo pomiędzy sześcioma najważniejszymi gatunkami tego rodzaju w ramach tzw. trójkąta U.

Rzepak — *B. napus* var. *oleifera* — charakteryzuje się stosunkowo niewielkim polimorfizmem w porównaniu do gatunków, z których powstał (Chen i Heneen, 1989). Dlatego w celu poszerzenia zakresu zmienności cech u tego gatunku stosuje się na szeroką skalę krzyżowania oddalone. Duże zróżnicowanie gatunków w obrębie rodzaju *Brassica* daje możliwość wprowadzenia licznych korzystnych cech do genomu *B. napus* na drodze krzyżowań oddalonych zarówno z formami dzikimi, jak i uprawnymi. Dzięki temu udało się między innymi przenieść do *B. napus* cechę męskiej sterylności z *Raphanus sativus* (Ogura 1968), czy stworzyć genotypy rzepaku przystosowane do warunków krótkiego dnia (Akbar 1989).

Jedną z cech nie występującą w warunkach naturalnych u *B. napus*, a spotykaną stosunkowo często u innych gatunków *Brassica* jest żółta barwa nasion (Liu i in. 1991). Cecha ta w hodowli rzepaku jest bardzo pożądana, gdyż wiąże się z licznymi korzyściami. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że żółte nasiona charakteryzują się podwyższoną zawartością białka i tłuszczu przy jednoczesnym spadku zawartości włókna pokarmowego (Stringam i in. 1974, Shirzadegan i Röbbelen 1985, Ochodzki i Piotrowska 2002). Zależność ta wynika z faktu, że żółte nasiona w porównaniu do nasion czarnych posiadają cieńszą okrywę nasienną, której głównym składnikiem jest nieprzyswajalne dla zwierząt włókno. Obniżenie zawartości tego składnika w nasionach jest cechą pożądaną, gdyż jego zbyt wysoka zawartość w rzepakowej śrucie poekstrakcyjnej jest czynnikiem limitującym wykorzystanie tej wysokobiałkowej paszy w żywieniu zwierząt (Słominski i in. 1999). A zatem śruta uzyskana z żółtonasiennych odmian *B. napus* mogłaby stać się konkurencyjna dla wykorzystywanej obecnie na szeroką skalę śruty sojowej.

W związku z tym, że w naturze nie występują genotypy *B. napus* o żółtej barwie nasion wydaje się, że obok mutagenety, najefektywniejszą metodą introgresji tej cechy do genotypu rzepaku jest krzyżowanie oddalone (Zaman 1988). Jako pierwszy próby tej podjął się Olsson (1960), który otrzymał segregację pod względem barwy nasion u zresyntetyzowanego rzepaku. Jednak pomimo prób nie udało mu się ustabilizować tej cechy. Od tego czasu liczni badacze starali się uzyskać żółtonasienny rzepak na drodze bezpośredniej resyntezy z *B. rapa* i *B. oleracea* (Chen i in. 1988; Rahman 2001), pośredniej resyntezy rzepaku z krzyżowań *B. juncea* i *B. carinata* (Barcikowska i Maćkowiak 1997) lub różnorodnych krzyżowań oddalonych rzepaku z żółtonasiennymi gatunkami *Brassica* (Qi i in. 1995, Meng i in. 1998).

Podstawowym problemem napotykanym podczas krzyżowań oddalonych jest niska efektywność wiązania mieszańcowych nasion. Spowodowane jest to występowaniem barier krzyżowalności, w wyniku czego efektywność krzyżowań jest z reguły niska. Bariery utrudniające otrzymywanie roślin mieszańcowych z krzyżowań oddalonych dzielą się na prezygotyczne i postzygotyczne. Pierwsze z nich związane są z niemożnością zapłodnienia pomimo zapylenia, natomiast bariery postzygotyczne powodują problemy w otrzymywaniu mieszańców oddalonych pomimo zajścia procesu zapłodnienia (Springer 2004).

Ocenę efektywności krzyżowań w prezentowanej pracy przeprowadzono w oparciu o stopień wnikania łagiewek pyłkowych. Według Gates'a i Ockendon'a (1975) bezpośrednią i pewną miarą zdolności kojarzeniowej jest stopień kiełkowania łagiewek pyłkowych. Pogląd ten znajduje także potwierdzenie w niniejszej pracy, gdyż z każdej kombinacji, w której obserwowano moment wnikania łagiewek do załączka otrzymano nasiona. Wyniki uzyskane z przeprowadzonych obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka wskazują, że zgodność krzyżowa pomiędzy *B. napus* a czterema gatunkami użytymi w doświadczeniu jako formy ojcowskie (*B. carinata*, *B. fruticulosa*, *B. juncea*, i *B. rapa*) jest stosunkowo wysoka dla wszystkich badanych gatunków. Obserwowane różnice w intensywności wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególnych kombinacjach krzyżowań były niewielkie i mieściły się w zakresie różnic występujących pomiędzy poszczególnymi genotypami jednego gatunku użytego w doświadczeniu. Stwierdzono jednak, że we wszystkich kombinacjach krzyżówkowych penetracja załączni i wnikanie łagiewek pyłkowych do załączków było słabsze niż w zapyleniu kontrolnym *B. napus* (CMS)  $\times$  *B. napus*.

Obecność licznych kiełkujących ziaren pyłku na znamieniu oraz łagiewek pyłkowych występujących w poszczególnych częściach słupka we wszystkich wykonanych kombinacjach krzyżówkowych dowodzi braku istnienia barier prezygotycznych pomiędzy krzyżowanymi gatunkami.

Podobne wyniki w obrębie krzyżowania *B. napus*  $\times$  *B. fruticulosa* otrzymali także Singh i in. (2007), którzy stopień kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka określają mianem „obfitego” i postulują brak barier prezygotycznych pomiędzy tymi gatunkami. Zbliżone wyniki w obrębie krzyżowań rzepaku ozimego — *B. napus*  $\times$  *B. fruticulosa* i *B. napus*  $\times$  *B. rapa* — otrzymali również Wojciechowski i in. (1997), którzy zaobserwowali jednak różnice w intensywności wnikania łagiewek pyłkowych pomiędzy tymi dwoma krzyżowaniami. Otrzymane przez nich wyniki sugerują niższą zgodność krzyżową w obrębie kombinacji *B. napus*  $\times$  *B. fruticulosa*, w której intensywność wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka była dwukrotnie niższa w porównaniu z kombinacją *B. napus*  $\times$  *B. rapa*. Obserwacji tej nie potwierdzają wyniki otrzymane w prezentowanej pracy, gdzie zgodność krzyżowa w obrębie kombinacji *B. napus*  $\times$  *B. fruticulosa* i *B. napus*  $\times$  *B. rapa* była zbliżona.

Wojciechowski i Lewandowska (2006) nie obserwowali żadnych łagiewek pyłkowych w zalążni w obrębie kombinacji *B. napus* × *B. carinata* i tylko sporadycznie łagiewki w zalążni i wnikające do zarodków w obrębie krzyżowania *B. napus* × *B. rapa* ssp. *sarson*. Uzyskane różnice w powyższych eksperymentach i przedstawionej pracy mogą wynikać jednak z innego pochodzenia użytych materiałów roślinnych, jak i odmiennych warunków środowiskowych panujących w trakcie przeprowadzania doświadczeń. Wpływ warunków środowiskowych na różnice w efektywności krzyżowań oddalonych postuluje także Wojciechowski (1985), który dodatkowo za najważniejszy czynnik uważa temperaturę w trakcie zapylenia.

Podobny we wszystkich kombinacjach krzyżówkowych stopień zgodności kojarzeniowej, określony na podstawie stopnia wnikania łagiewek pyłkowych, nie do końca znalazł potwierdzenie w stopniu wiązania nasion. Najwyższy współczynnik efektywności krzyżowań (wyrażający liczbę dorodnych nasion do liczby zapylnych kwiatów) otrzymano w kombinacjach *B. napus* × *B. rapa* i wyniósł on średnio 5,12 dla wszystkich użytych genotypów, wykazując jednak spory zakres rozbieżności i osiągając maksimum w kombinacji *B. napus* × *B. rapa* var. *Indus* (13,58). Pozostałe krzyżowania z *B. juncea*, *B. carinata* i *B. fruticulosa* odznaczały się niższymi średnimi wartościami współczynnika efektywności krzyżowania, wynoszącymi odpowiednio: 1,57; 0,16 i 0,02. Różna efektywność krzyżowań w oparciu o stopień wnikania łagiewek pyłkowych w stosunku do wartości opartych o liczbę uzyskanych nasion oraz duża liczba wykształconych, ale pustych łuszczyń może świadczyć o występowaniu barier postzygotycznych o różnej sile, prowadzących do zamierania zarodka na wczesnym etapie rozwoju. Podobne wyniki otrzymali Wojciechowski i in. (1997), którzy w krzyżowaniach z użyciem ozimych form rzepaku najwyższą efektywność krzyżowań zaobserwowali dla *B. napus* × *B. rapa*, a znacznie niższą dla *B. napus* × *B. fruticulosa*. Również Rashid i in. (1994) otrzymali podobną efektywność w obrębie krzyżowania *B. napus* × *B. juncea* (2,1). Ci sami autorzy w krzyżowaniach *B. napus* × *B. carinata* otrzymali wartość współczynnika efektywności krzyżowania 8,2, która jest znacznie wyższa od wartości uzyskanej pomiędzy tymi gatunkami w toku naszych badań (0,16).

Spośród czternastu genotypów *B. juncea* użytych w eksperymencie interesujący wydaje się być genotyp CR 2514/93a, który charakteryzował się wysokim poziomem współczynnika efektywności krzyżowań z *B. napus* (11,02) i znacznie odbiegał od średniej wartości tego współczynnika dla pozostałych kombinacji krzyżowań z *B. juncea* (1,57). Wydaje się zatem, że genotyp ten jako stosunkowo wysoko zgodny w krzyżowaniach z *B. napus* mógłby być szerzej wykorzystany w toku dalszych prac hodowlanych. Występowanie genotypów o dużo wyższej od przeciętnej zgodności krzyżowej obserwowali także inni autorzy m.in. w obrębie krzyżowań *B. rapa* × *B. carinata* (Meng i in. 1992). Rozbieżności uzyskane w niniejszej pracy pomiędzy wartościami współczynnika efektywności krzyżowań dla poszczególnych genotypów tego samego gatunku dowodzą słuszności tezy, że

efektywność krzyżowań oddalonych uzależniona była nie tylko od doboru poszczególnych gatunków czy podgatunków do krzyżowań — jak twierdzą m.in. Nishiyama i Inomata (1966), ale nawet od doboru poszczególnych genotypów wykorzystywanych do otrzymania mieszańców oddalonych, co postulowali m.in. Honma i Summers (1976) oraz Bajaj (1986), Wojciechowski i Lewandowska (2006).

Barwa nasion mieszańców pokolenia  $F_1$  z wykonanych krzyżowań była w przeważającej większości czarna, stosunkowo liczne były także nasiona koloru brązowego. Nasion o żółtej barwie otrzymano bardzo mało i tylko w niektórych kombinacjach, gdzie jako zapylaczy użyto genotypów *B. rapa*. W kombinacjach z innymi gatunkami nasion żółtych nie obserwowano. Podobne wyniki uzyskała Lewandowska (2005), która nieliczne żółte nasiona pokolenia  $F_1$  otrzymała tylko w obrębie kombinacji, gdzie jako zapylaczy dla ozimego *B. napus* użyła dwóch podgatunków *B. rapa* ssp. *pekinensis* i ssp. *sarson*. Tak niewielką segregację pod względem barwy nasion można tłumaczyć tym, że pigment zabarwiający okrywę nasienną jest umiejscowiony w palisadowych i parenchymatycznych warstwach okrywy nasiennej (Stringam i in. 1974), które to rozwijają się z organizmu matecznego. Dodatkowym problemem jest złożone podłoże genetyczne tej cechy. Większość badaczy przychyliła się tu do tezy Shirzadegana (1986), że cecha ta jest kontrolowana przez trzy pary genów. Barwę żółtą uzyskuje się wtedy, gdy wszystkie allele tych genów będą w stanie homozygoty recesywnej. Jak jednak donoszą najnowsze badania Somersa i in. (2001) geny te nie są równo silne. Autorzy ci podają, że ustalili marker RAPD sprzężony z loci odpowiedzialnym w 72,3% za cechę żółtej barwy okrywy nasiennej w segregujących pod względem barwy nasion liniach podwojonych haploidów.

## Wnioski

---

1. Zgodność krzyżowa pomiędzy gatunkami użytymi w doświadczeniu, ustalona na podstawie obserwacji kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych była stosunkowo wysoka we wszystkich kombinacjach krzyżówkowych co świadczy o braku barier prezygotycznych w wykonanych kombinacjach krzyżowań.
2. Zgodność krzyżowa ustalona na podstawie wiązania nasion dowodzi istnienia stosunkowo silnych barier postzygotycznych w kombinacjach krzyżówkowych *B. napus* × *B. carinata* i *B. fruticulosa*. Stąd też dla zwiększenia efektywności krzyżowań w tych kombinacjach celowe będzie w przyszłości zastosowanie kultur izolowanych zarodków.

## Literatura

- Akbar M.A. 1989. Resynthesis of *Brassica napus* aiming for improved earliness and carried out by different approaches. *Hereditas*, 111: 239-246.
- Bajaj Y.P.S., Mahajan S.K., Labana K.S. 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea* through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica*, 35: 103-109.
- Barcikowska B., Maćkowiak M. 1997. Pigmentacja okrywy nasiennej – F2 żółtonasiennych form *B. juncea* Coss. × *B. carinata* Braun. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVIII (1): 99-102.
- Bartkowiak-Broda I., Mikołajczyk K. 2003. Wykorzystanie metod biologii molekularnej w hodowli jakościowej rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 3: 9-13.
- Chen B.Y., Haneen W.K. 1989. Resynthesized *Brassica napus* L.: A review of its potential in breeding and genetic analysis. *Hereditas*, 111: 255-263.
- Chen B.Y., Haneen 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.
- Gates P.J., Ockendon D.J. 1975. Seed set and pollen tube growth as a measure of self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Incomp. Newslett. Eucarpia*, 19: 21-22.
- Gladis T., Hammer K. 1992. The Brassica collection in Gatersleben: *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*. *Feddes Rep.*, 103: 469-507.
- Honma S., Summers W.L. 1976. Interspecific hybridization in *Brassica napus* L. (Napobrassica group) and *B. oleracea* L. (Botrytis group). *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 101: 299-302.
- Karpechenko G.D. 1924. Hybrids of *Raphanus sativus* × *Brassica oleracea* L. *J. Genet.*, 14: 375-396.
- Kräling K. 1987. Utilization of genetic variability of resynthesized rapeseed. *Plant Breeding* 99: 209-217.
- Lewandowska L. 2005. Ocena efektywności krzyżowań oddalonych linii MS rzepaku ozimego z gatunkami o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej z zastosowaniem kultur zarodkowych. *Praca magisterska. AR Poznań*.
- Liu H., Han J., Hu X. 1991. Studies on the inheritance of seedcoat color and other related characters of yellow-seeded *Brassica napus*. *Proceedings of 8th International Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada*, 1438-1444.
- Martin F.W. 1959. Staining and obserwing pollen tubes by means fluoerscence. *Stain Technol.*, 34: 125-128.
- Meng J., Shi S., Gan L., Li Z., Qu X. 1998. The production of yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrids of *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica*, 103: 329-333.
- Meng J., Wu J., Wang P. 1992. The crossability between *Brassica carinata* and *B. campestris* and between *B. carinata* and *B. juncea*. *J. Huazhong Agricultural University*, 11: 203-207.
- Nishiyama I., Inomata N. 1966. Embriological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x in *Brassica*. *Japan J. Genet.*, 41: 27-42.
- Ogura H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish with specific reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, 6: 39-78.
- 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 crossing within the genus *Brassica*, II. Artificial *Brassica napus* L. *Hereditas*, 46: 357-396.
- Qi C.K., Fu S.Z. Pu H.M. 1995. A successful transfer of yellow-seeded trait from *Brassica carinata* to *B. napus*. Proceedings of 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, England, 4: 1137-1140.
- Rahman M.H. 2001. Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding*, 120: 463-472.
- Rashid A., Rakow G., Downey R.K. 1994. Development of yellow seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding*, 112: 127-134.
- Shirzadegan M. 1986. Inheritance of seed color in *Brassica napus* L. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 96: 140-146.
- Shirzadegan M., Röbbelen 1985. Influence of seed color and hull proportion on quality properties of see in *Brassica napus* L. *Fette, Seifen. Anstrichmittel*, 6: 235-237.
- Singh R., Shivanna K.R., Prakash S. 2007. Studies on crossability barriers between cultivated species and wild allies of crop *Brassicac*s. Proceedings of 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China, Genetics and Breeding: Genetics and Germplasm: 272-276.
- Slominski B.A., Simbaya J., Campbell L.D., Rakow G., Guenter W. 1999. Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 78: 249-262.
- Stringam G.R., Mc Gregor D.J., Pawłowski S.H. 1974. Chemical and morphological characteristics associated with seed coat colour in rapeseed. Proc. 4th Int. Rapeseed Conf., Giessen, Germany: 90-108.
- Somers D.J., Rakow G., Prabhu V.K., Friesen K.R.D. 2001. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome*, 44: 1077-1082.
- Springer B. 2004. Bariery krzyżowalności w rodzaju *Brassica*. Praca doktorska. AR Poznań.
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J. Bot.*, 7: 389-452.
- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. and *B. oleracea* L. I. Effectiveness of crossing, pollen tube growth, embryogenesis. *Genetica Polonica*, 26: 423-436.
- Wojciechowski A., Lewandowska L. 2006. Ocena efektywności krzyżowań oddalonych linii MS *B. napus* z gatunkami *Brassica* o żółtej i brązowej barwie okrywy nasiennej z zastosowaniem kultur zarodkowych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXVII: 20-32.
- Wojciechowski A., Nowak K., Olejniczak J. 1997. Wstępne wyniki krzyżowań międzygatunkowych pomiędzy *Brassica napus*, *B. oleracea*, *B. campestris* i *B. fruticulosa*. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVIII: 91-98.
- Zaman M.W. 1988. Limitations for introgression of yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Sveriges Utsadesförenings Tidskrift*, 99: 205-207.