

Błażej Springer, Sylwia Mikołajczyk, Piotr Świątek

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

Zastosowanie kultur in vitro izolowanych zarodków w krzyżowaniach oddalonych rzepaku (*Brassica napus* L.) z wybranymi żółtonasiennymi gatunkami *Brassica*

The application of embryo rescue technique in interspecific crosses of oilseed rape (*Brassica napus* L.) with some yellow seeded *Brassica* species

Słowa kluczowe: rzepak jary, barwa nasion, zarodkowe kultury in vitro

Prowadzono badania nad krzyżowaniem męskosterylnej linii (CMS Ogura) rzepaku jarego (*B. napus*) z trzema innymi gatunkami *Brassica* charakteryzującymi się żółtą barwą okrywy nasiennej: rzepikiem (*B. rapa*), gorczycą sarepską (*B. juncea*) oraz gorczycą etiopską (*B. carinata*). Badano efektywność regeneracji zarodków pochodzących z krzyżowań oddalonych w kulturach in vitro. Wydajność kultur in vitro obliczono stosunkiem liczby zregenerowanych roślin do ogólnej liczby inkubowanych na pożywki zarodków. Zarodki izolowano w dwudniowych odstępach, począwszy od 14 dnia po zapyleniu i dalej prowadzono w kulturze in vitro. Zregenerowano rośliny tylko z zarodków kombinacji *B. napus* × *B. rapa*

Key words: spring oilseed rape, seed colour, embryo rescue in vitro

In this study interspecific crosses between male sterile (CMS Ogura) oilseed rape (*B. napus*) with turnip rape (*B. rapa*), Indian mustard (*B. juncea*) and Ethiopian mustard (*B. carinata*) were made. Effectiveness of embryo rescue in vitro cultures was investigated. The effectiveness of *in vitro* cultures was estimated by the ratio of number of regenerated plants to the total number of embryos incubated on the media. Fourteen day old embryos and older ones, isolated every second day following cross pollinations were cultured on media. The only regenerated plants from *in vitro* cultures were obtained from *B. napus* × *B. rapa* crosses.

Wstęp

Rzepak (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) z gospodarczego punktu widzenia jest najważniejszą rośliną oleistą uprawianą w Polsce. Łączna powierzchnia jego uprawy stanowi ok. 95–97% powierzchni zasiewów roślin oleistych w naszym kraju. Ważnymi osiągnięciami w hodowli rzepaku, które umożliwiły tak szerokie jego wykorzystanie, było uzyskanie odmian o zredukowanej zawartości glukozyolanów

oraz wyeliminowanie kwasu erukowego ze składu kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym. Pomimo znacznego obniżenia zawartości substancji antyżywnościowych w nasionach wykorzystanie poekstrakcyjnej śruty rzepakowej jest nadal ograniczone z uwagi na wysoką zawartość w niej włókna. Badania histologiczne wykazały, iż żółtonasienne formy w obrębie rodzaju *Brassica* charakteryzują się cieńszą okrywą nasienną, która jest głównym źródłem włókna w nasionach. Dlatego uzyskanie form o żółtej barwie okrywy nasiennej jest kolejnym celem, przed jakim stoi hodowla rzepaku. Odmiany, które łączyłyby obniżoną zawartość, kwasu erukowego, glukozynolanów i włókna, określa się jako potrójnie ulepszone lub trójzerowe („000”).

Poważnym ograniczeniem w osiągnięciu żółtonasiennności jest brak naturalnie występujących genotypów żółtonasiennych w obrębie gatunku *B. napus*, jak i u formy *B. oleracea* — z której filogentycznie powstał rzepak. Introgresję tej cechy z żółtonasiennych gatunków *Brassica* do genotypu rzepaku można przeprowadzić na drodze krzyżowań oddalonych.

Istotną przeszkodą w krzyżowaniach oddalonych są często występujące zaburzenia w rozwoju zarodka, uniemożliwiające prawidłowe wykształcanie się nasion mieszańcowych. Pomocne w przewycięzaniu tych barier mogą być metody biotechnologiczne, jakimi są kultury *in vitro* izolowanych zarodków.

Celem niniejszej pracy była ocena efektywności krzyżowań oddalonych rzepaku z wybranymi gatunkami *Brassica* o żółtej barwie nasion przy wykorzystaniu zarodkowych kultur *in vitro*.

Material i metody

Materiał roślinny, który został użyty do badań zestawiono w tabeli 1.

Doświadczenie założono w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu. Kontrolowane zapylenia formy CMS rzepaku jarego pyłkiem wyżej wymienionych gatunków z rodzaju *Brassica* wykonano w okresie jesiennym. Następnie z rozwijających się łuszczyń izolowano zarodki, które przenoszono na pożywki w kulturach *in vitro*.

Efektywność kultur *in vitro* zarodków z krzyżowań oddalonych w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych wyrażono jako procentowy stosunek liczby zregenerowanych roślin do sumy izolowanych zarodków. Izolację zarodków rozpoczęto po czterech dniach od kontrolowanego zapylenia.

Kultury zarodkowe prowadzono na pożywkach Murashige-Skoog'a (MS), (Murashige i Skoog 1962), Murashige-Skoog'a w modyfikacji Kellera (MS_K), (Keller i Armstrong 1977) oraz Nitsh'a i Nitsh'a (H₃), (Nitsh i in. 1969).

Tabela 1

Materiał roślinny użyty do krzyżowań — *Plant material used for crosses*

Formy użyte w doświadczeniu <i>Plant material</i>	Nazwa zwyczajowa i kolor nasion <i>Common name and seed color</i>	Ploidalność i liczba chromosomów <i>Genomes and chromosomes number</i>	Pochodzenie <i>Seed origin</i>
<i>Forma żeńska — Maternal form</i>			
<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i> f. <i>annua</i> — Olindigo (CMS Ogura)	rzepak czarny <i>oilseed rape black</i>	2n = AACC = 38	Euralis Semences, Francja
<i>Formy zapylające — Pollinators</i>			
<i>B. juncea</i> CR 2629/84 <i>B. juncea</i> CR 2634/84 <i>B. juncea</i> CR 94/99 <i>B. juncea</i> CR 2486/8 <i>B. carinata</i>	gorczyca sarepska żółta <i>Indian mustard yellow</i>	2n = AABB = 36	IPK Genebank, Gatersleben, Niemcy
	gorczyca etiopska żółta <i>Ethiopian mustard yellow</i>	2n = BBCC = 34	Institute for Agrobotany, Tapioszele, Węgry
<i>B. rapa</i> 2220/93 <i>B. rapa</i> 2244/01 <i>B. rapa</i> 2344/98 <i>B. rapa</i> var. <i>Indus</i>	rzepik żółty <i>turnip rape yellow</i>	2n = AA = 20	Bank Genów Oseva PRO, Opava, Czechy

Zarodki, w stadiach od sercowatego do prawie dojrzałego, były umieszczane na pożywce MS. Na płytce umieszczano od 1 do 6 zarodków. Hodowlę prowadzono w pokoju hodowlanym, w temperaturze 26°C i fotoperiodzie 16 godzin — faza jasna i 8 godzin — faza ciemna. Schemat prowadzenia zarodkowych kultur in vitro na pożywkach przedstawiono poniżej:

$$MS \rightarrow MS_k \rightarrow H_3 \rightarrow \text{Gleba sterylna}$$

Wyniki

W wyniku przeprowadzonych krzyżowań oddalonych zebrano 277 łuszczyń z których pozyskano 2892 załączki. Z załączków wyizolowano 1857 zarodków (tab. 2). Liczba zarodków przenoszonych na pożywki była ograniczona z przyczyn technicznych (zbyt wczesne stadium rozwojowe), ponadto część ulegała zniszczeniu w trakcie izolacji.

Izolowane zarodki, w zależności od kombinacji krzyżowania oraz liczby dni od zapylenia, znajdowały się w stadiach: sercowatym, torpedy, łaski oraz prawie dojrzałym.

Tabela 2

Liczba izolowanych zarodków na pożywkę in vitro w dniach od zapylenia krzyżowego
Number of embryos isolated on in vitro media in particular time after pollination

Kombinacja krzyżowania <i>Crossing combination:</i> <i>Brassica napus</i> ×	Liczba izolowanych zarodków — <i>Number of isolated embryos</i>									
	Liczba dni od zapylenia po których zarodki izolowano <i>Time after pollination to embryo isolation [days]</i>									
	14–15	16–17	18–19	20–21	22–23	24–25	26–27	28–29	30–31	Razem <i>Total</i>
<i>B. juncea</i> 2629/84	36	16	14	14	38	38	0	16	17	189
<i>B. juncea</i> 2634/84	6	12	46	33	64	23	30	0	0	214
<i>B. juncea</i> 94/99	12	22	72	52	44	12	16	0	0	230
<i>B. juncea</i> 2486/8	17	42	16	48	32	20	0	0	0	175
Suma — <i>Sum</i>	71	92	148	147	178	93	46	16	17	808
<i>B. carinata</i>	4	0	13	0	13	0	18	0	0	48
<i>B. rapa</i> 2220/93	79	12	39	8	22	62	0	0	0	222
<i>B. rapa</i> 2244/01	17	86	35	62	27	0	0	0	0	227
<i>B. rapa</i> 2344/98	90	24	64	21	0	0	0	0	0	199
<i>B. rapa</i> odm. Indus	21	46	42	80	136	28	0	0	0	353
Suma — <i>Sum</i>	207	168	180	171	185	90	0	0	0	1001

W krzyżowaniach *B. napus* × *B. juncea* wyizolowano ogółem 808 zarodków. Natomiast w kombinacjach *B. napus* × *B. rapa* na pożywkę przeniesiono 1001 zarodków. Najmniejszą liczbę zarodków uzyskano w kombinacji krzyżówkowej *B. napus* × *B. carinata* — 48 szt.

Izolację zarodków z krzyżowań rzepaku (*B. napus*) z rzepikiem (*B. rapa*) przeprowadzano w zależności od kombinacji krzyżówkowej pomiędzy 14 a 25 dniem od zapylenia.

W kombinacjach krzyżówkowych, w których jako zapylacza użyto gorczycę sarepską (*B. juncea*) zarodki izolowano między 14 a 31 dniem od zapylenia. W zależności od użytego genotypu *B. juncea*, zarodki pobierano do 25 (genotypy: 2629/84 i 2486/8), 27 (genotypy: 2634/84, 94/99) lub aż do 31 dnia po zapyleniu (genotyp 2629/84).

Z krzyżowań gorczycy etiopskiej (*B. carinata*) jako zapylacza, na pożywkę przeniesiono najmniejszą liczbę zarodków spośród wszystkich badanych kombinacji krzyżówkowych — 48 sztuk. Ponadto zarodki izolowano w nieregularnych odstępach do 27 dni od zapylenia. Szczegółowe zestawienie liczby dni od zapylenia, po których izolowane zarodki z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych przenoszono do kultur in vitro zestawiono w tabeli 2.

W przeprowadzonym doświadczeniu z kultur in vitro niedojrzałych zarodków zregenerowano 84 (tab. 3), co w odniesieniu do sumy izolowanych zarodków stanowi efektywność 4,52%. Wszystkie uzyskane rośliny pochodziły z krzyżowania

rzepaku z rzepikiem; największą ich liczbę uzyskano wówczas, gdy jako zapylacza użyto odmianę Indus — 39 roślin (efektywność kultur zarodkowych — 11,05%). Dla kolejnych genotypów efektywność ta wynosiła: *B. rapa* 2244/01 — 30 roślin (13,22%), *B. rapa* 2220/93 — 12 roślin (5,40%) oraz 3 (1,50%) rośliny gdy zapylaczem był genotyp *B. rapa* 2344/98 (tab. 3).

Tabela 3

Procent zregenerowanych roślin z zarodków izolowanych w dniach od zapylecia
Per cent of plants regenerated in particular time of embryos isolation

Kombinacja krzyżowania <i>Crossing combination</i> <i>Brassica napus</i> ×	Procent zregenerowanych roślin — <i>Per cent of regenerated plants</i>									
	Czas od zapylecia krzyżowego do izolacji zarodków [dni] <i>Time after pollination to embryo isolation [days]</i>									
	14–15	16–17	18–19	20–21	22–23	24–25	26–27	28–29	30–31	Razem <i>Total</i> % szt.
<i>B. juncea</i> 2629/84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. juncea</i> 2634/84	0	0	0	0	0	0	0	–	–	0
<i>B. juncea</i> 94/99	0	0	0	0	0	0	0	–	–	0
<i>B. juncea</i> 2486/8	0	0	0	0	0	0	0	–	–	0
<i>B. carinata</i>	0	0	0	0	0	0	0	–	–	0
<i>B. rapa</i> 2220/93	2,53	16,67	5,13	12,50	18,18	2,08	–	–	–	5,40 12
<i>B. rapa</i> 2244/01	5,88	3,49	0	33,87	18,52	–	–	–	–	13,22 30
<i>B. rapa</i> 2344/98	1,11	0	0	9,52	–	–	–	–	–	1,50 3
<i>B. rapa</i> odm. Indus	0	20,69	7,14	12,08	8,82	3,57	–	–	–	11,05 39

Dyskusja

Uprawa odmian o dobrych cechach użytkowych w najwyższym stopniu decyduje o wielkości i jakości plonu, ponadto jest najtańszym elementem intensyfikującym technologię uprawy (Bartkowiak-Broda 2006).

Od początku lat 60. głównym celem hodowli rzepaku stała się poprawa cech związanych z jakością nasion. Potwierdzenie szkodliwości kwasu erukowego, który stanowił blisko 50% kwasów tłuszczowych w oleju oraz liczne doniesienia ukazujące szkodliwość glukozyolanów zawartych w śrucie poekstrakcyjnej stały się impulsem do prac nad jakością pozyskiwanych nasion rzepaku. W 1972 r. zarejestrowano pierwszą na świecie niskoerukową odmianę rzepaku Wipol, a w 1976 r. pierwszą polską bezerukową odmianę rzepaku Janpol. Odmiany o wysokiej zawartości kwasu erukowego zostały całkowicie wyparte z uprawy przez odmiany bezerukowe („0”) w końcu lat 80. W 1985 r. zarejestrowano i zaczęto uprawiać pierwszą polską odmianę podwójnie ulepszoną („00”), o obniżonej zawartości szkodliwych glukozyolanów (Krzymański 2000).

Prace nad ulepszeniem parametrów jakościowych nasion rzepaku są kontynuowane. Hodowcy dążą do obniżenia zawartości włókna oraz podniesienia zawartości tłuszczu i białka w nasionach. Cel ten może być zrealizowany poprzez wyhodowanie form żółtonasiennych. O zaletach form żółtonasiennych występujących w rodzaju *Brassica* donosi wielu badaczy, m.in. Stringam (1974) i Woods (1980).

Okrywa nasienna u *Brassica* jest zbudowana z warstwy komórek palisadowych, kilku warstw komórek parenchymatycznych oraz pojedynczej warstwy komórek aleuronowych (van Caseele i in. 1982). Pigment (skondensowane polifenole), który nadaje barwę tradycyjnym czarnonasiennym odmianom rzepaku, znajduje się w warstwie komórek palisadowych i warstwie komórek parenchymatycznych (Vaughan 1970, Stringam i in. 1974). Warstwa komórek palisadowych gromadzi w sobie ligniny, celulozy, hemicelulozy, pektyny oraz pentozany (Schirzadegan i Röbbelen 1985). Obecność tych związków w poekstrakcyjnej śrucie rzepakowej obniża strawność tej wysokobiałkowej, zawierającej 41–49% białka paszy (Bengtsson 1985) i pogarsza jej wykorzystanie przez zwierzęta. Formy żółtonasienne u *Brassica*, w porównaniu do form czarnonasiennych charakteryzują się cieńszą warstwą komórek palisadowych. Dzięki temu formy żółtonasienne charakteryzują się obniżoną zawartością niepożądanego w paszy włókna, a uzyskiwana z nich śruta poekstrakcyjna jest lepiej wykorzystywana przez zwierzęta (Bell i Shires 1982). Nasiona rzepaku są niewielkie (masa 100 nasion wynosi 4–5 g), dlatego wyżej opisane zmiany w budowie okrywy nasiennej powodują, iż zarodki, w których głównie zgromadzone są tłuszcz i białko, stanowią wtedy proporcjonalnie większą część masy nasiona. Prace mające na celu porównanie zawartości tłuszczu i białka u form żółto- i czarnonasiennych w obrębie rodzaju *Brassica* prowadzili:

- dla *B. napus* — Shirzadegan i Röbbelen (1985), Liu i in. (1991), Rashid i in. (1994);
- dla *B. rapa* — Jönsson i Bengtsson (1970), Stringam i in. (1974), Theander i in. (1977), Hutcheson (1984), Daun i DeClerq (1988);
- dla *B. carinata* — Woods (1980);
- dla *B. juncea* — Getinet (1986).

Badania tych autorów dowiodły, że jasne nasiona u gatunków z rodzaju *Brassica*, w porównaniu do ciemnych, zawierają średnio o około 2% oleju i 1% białka więcej.

Opisane wyżej zalety form żółtonasiennych — obniżona zawartość włókna przy jednoczesnym podwyższeniu zawartości białka i tłuszczu w nasionach — wzbudzają niemałe zainteresowanie hodowców dążących do wprowadzenia żółtonasienności u rzepaku (*B. napus*). W przeciwieństwie do rzepaku, znane są żółtonasienne formy *B. rapa*, *B. juncea* oraz *B. carinata* (Liu i in. 1991). W 1929 r. Morinaga na podstawie obserwacji cytologicznych sformułował teorię o amfidiploidalnej naturze rzepaku, według której rzepak jest naturalnym, międzygatunkowym mieszań-

cem (o poziomie ploidalności $2n = 4x = 38$) powstałym przez skrzyżowanie się rzepiku (*B. rapa*) oraz kapusty (*B. oleracea*). Teoria ta znalazła potwierdzenie w wynikach prac U (1935), który na podstawie analizy chromosomów określił pokrewieństwo pomiędzy gatunkami *Brassica*.

Genomowe powiązania pomiędzy różnymi gatunkami z rodzaju *Brassica* oraz amfidiploidalna natura rzepaku stwarzają możliwość przeniesienia wielu cech, w tym żółtonasienności, do rzepaku na drodze krzyżowań z innymi gatunkami, wśród których ta cecha występuje. Cel ten może być realizowany poprzez tzw. resyntezę rzepaku, czyli krzyżowanie gatunków, z których filogenetycznie powstał rzepak.

Resynteza *B. napus*, z wykorzystaniem form rodzicielskich o pożądanym cechach umożliwiła już wprowadzenie do tego gatunku cechy wczesności (Akbar 1987), obniżenie zawartości kwasu linolenowego w nasionach (Heath i Earle 1997) oraz wprowadzenie tolerancji na atrazyny (Journdan i in. 1989). Resynteza rzepaku (*B. napus* AACCC = 38) z wykorzystaniem żółtonasiennych form rodzicielskich jest jednak ograniczona z uwagi na brak żółtonasiennych genotypów w gatunku *B. oleracea* (od którego pochodzi genom C). Bechyne (1987) krzyżując żółtonasienny rzepik (odm. Yellow Sarson) z czarnonasienną kapustą (var. *acephala*) otrzymał zaledwie jedną roślinę o pośrednim zabarwieniu nasion pomiędzy formami rodzicielskimi. Podobne wyniki uzyskał Chen i in. (1988) krzyżując brązowonasienną *B. oleracea* z żółtonasiennymi formami *B. rapa*. Chen i in. (1988) sugerują, że etapem pośrednim na drodze do otrzymania żółtonasiennego rzepaku mogłoby być wprowadzenie żółtonasiennego genotypu *B. oleracea*.

Innym sposobem stosowanym w celu wprowadzenia cechy żółtonasienności jest krzyżowanie rzepaku z różnymi formami żółtonasiennymi *Brassica*, o różnym poziomie ploidalności, czyli tzw. krzyżowanie oddalone. Wielu badaczy próbowało uzyskać żółtonasienne formy rzepaku w ten sposób. Zaman (1989) przeprowadził doświadczenie, którego jednym z celów było uzyskanie żółtonasiennego rzepaku na drodze krzyżowań *B. napus* z innymi gatunkami *Brassica*. Poprzez dobór do krzyżowań form żółtonasiennych i późniejszą selekcję uzyskał rzepak o barwie nasion od brązowej do częściowo żółtej. Rashid i in. (1994) wykonali szereg krzyżowań rzepaku z gorczycą etiopską i gorczycą sarepską, mających na celu połączenie genomu A pochodzącego z *B. juncea* (AABB) oraz genomu C pochodzącego z *B. carinata* (BBCC). Po serii krzyżowań wstecznych z *B. napus* badacze ci uzyskali w pokoleniu F_2 91 roślin żółtonasiennych, spośród wszystkich uzyskanych 4858 roślin. Liu (1983) oraz Liu i Gao (1987) uzyskali żółtonasienny rzepak drogą krzyżowań jasnonasiennej linii *B. napus* z *B. rapa* ssp. *chinensis*, jednak otrzymana linia charakteryzowała się niepełną żółtą barwą i niestabilnością tej cechy w kolejnych generacjach. Shirzadegan i Röbbelen (1985) oraz Baetzel i in. (1999) donoszą o uzyskaniu żółtonasiennego rzepaku drogą krzyżowań jasnonasiennej linii *B. oleracea* i żółtonasiennego *B. rapa*. Rashid i in. (1994) otrzymali żółtonasienne rośliny z krzyżowań oddalonych [*B. napus* × *B. juncea*] × *B. napus* ×

[(*B. napus* × *B. carinata*) × *B. napus*], przy czym zauważono wpływ temperatury na pojawianie się żółtego zabarwienia nasion w pokoleniu mieszańcowym.

Krzyżowania międzygatunkowe umożliwiają wprowadzenie wielu pożądanych cech gospodarczych z form dzikich do roślin uprawnych. Pomimo potencjalnych możliwości, jakie niosą ze sobą krzyżowania oddalone, niezgodność między krzyżowanymi gatunkami często uniemożliwia efektywne krzyżowanie i tym samym powstanie mieszańców wartościowych ze względu na kombinację cech występujących u rodziców. Niezgodność międzygatunkowa może się ujawnić w różnych stadiach cyklu rozmnażania. Dlatego wyodrębnia się dwie grupy barier uniemożliwiających lub w znacznym stopniu utrudniających krzyżowanie międzygatunkowe. Pierwsza, zaliczana do barier prezygotycznych, uniemożliwia dotarcie łagiewki do woreczka zalążkowego (działanie tych barier może być spowodowane przyczynami genetyczno-fizjologicznymi oraz morfologicznymi). Do drugiej grupy barier, nazywanych postzygotycznymi, zalicza się wszystkie zakłócenia, które zachodzą w okresie od zapłodnienia do powstania dojrzałego zarodka. Z badań przeprowadzonych przez Håkanson'a (1956), Olsson'a (1960), Inomatę (1967) oraz Wojciechowskiego (1985) wynika, iż najczęstszą przyczyną zamierania zarodków mieszańcowych w obrębie *Brassicaceae* jest nieprawidłowy rozwój bielma. Innym zaburzeniem postzygotycznym opisanym przez Wojciechowskiego (1985) jest nadmierny przerost tkanki somatycznej (*hyperlasis*), która odcina dopływ substancji dla rozwijającego się zarodka. Zarodek pozbawiony substancji odżywczych dostarczanych przez bielmo i tkanki macierzyste ma szansę dalszego rozwoju jedynie przy wykorzystaniu kultur *in vitro*, na sztucznym podłożu zawierającym niezbędne składniki pokarmowe. Metodą stosowaną w celu podniesienia efektywności krzyżowań oddalonych są kultury *in vitro* niedojrzałych zarodków. Pionierem kultur zarodków mieszańcowych roślinnych u *Brassica* był Karpechenko (1924), który otrzymał międzyrodzajowego mieszańca pomiędzy *Raphanus sativus* i *Brassica oleracea*. Kultury zarodkowe znalazły zastosowanie w resyntezie rzepaku na drodze krzyżowań *B. rapa* i *B. oleracea* (Olsson i Ellerstrom 1980, Wojciechowski 1985, Chen i in. 1988, Ozminkowski i Journdan 1994). Od tego czasu obserwuje się często wykorzystanie kultur zarodkowych w krzyżowaniach oddalonych.

W niniejszej pracy analizowano efektywność kultur *in vitro* zarodków uzyskanych poprzez kontrolowane zapylenie męskosterylnej formy rzepaku jarego żółtonasiennymi formami rzepiku, gorczycy sarepskiej i gorczycy etiopskiej.

Na tle wszystkich przeprowadzonych kombinacji krzyżówkowych, jedyną z której uzyskano zregenerowane w kulturach *in vitro* rośliny były krzyżowania *B. napus* z *B. rapa*. Ogółem z tej kombinacji otrzymano 84 rośliny z 1001 izolowanych zarodków (efektywność 8,39%). Spośród wszystkich form rzepiku użytych w doświadczeniu jako komponenty zapyłające, największą efektywność regeneracji zarodków w kulturach *in vitro* stwierdzono dla genotypu *B. rapa* 2244/01 — 30 zregenerowanych roślin z 227 izolowanych zarodków (efektywność 13,22%).

Wysoką zdolność regeneracyjną zarodków mieszańcowych *B. napus* × *B. rapa* zaobserwowali także Wojciechowski i Lewandowska (2006). Stosując kultury zarodkowe uzyskali ze 180 izolowanych zarodków 86 zregenerowanych roślin, co daje efektywność 47,77%.

W niniejszej pracy, stosując pożywkę MS o stężeniu sacharozy 2%, nie udało się otrzymać roślin z zarodków z kombinacji *B. napus* × *B. carinata*. Natomiast Szestowicka (1995) dla tej kombinacji, stosując pożywkę B5 zawierającą 10% stężenie sacharozy, uzyskała 10% efektywność kultur zarodkowych. Zastosowanie innej pożywki oraz innego stężenia sacharozy mogło być przyczyną innej wydajności regeneracji w badanej kombinacji.

W prezentowanej pracy wyizolowano na pożywki in vitro 808 zarodków pochodzących z krzyżowań *B. napus* z czterema genotypami *B. juncea*. Jednakże i w tej kombinacji krzyżówkowej kultury zarodkowe okazały się całkowicie nieefektywne. Natomiast Zhang i in. (2003), stosując kultury in vitro w hodowli zarodków mieszańcowych *B. napus* × *B. juncea*, donoszą o regeneracji zarodków z efektywnością 7,55% oraz dodają, że krzyżowanie zwrotne *B. juncea* × *B. napus* cechowało się wyższą efektywnością. Przyczyną osiągnięcia takich wyników przez tych autorów może być użyty genotyp bądź zastosowanie w pożywce wyższego stężenia hormonów roślinnych NAA i BAP (odpowiednio 0,3 i 2,0 mg/l) w pożywce hodowlanej MS_k niż stężenie podawane przez Keller'a (1977) (odpowiednio 0,02 i 1,13 mg/l), które zastosowano w prezentowanej pracy.

Liczba zregenerowanych w kulturach in vitro roślin, z uwzględnieniem czasu od zapylenia krzyżowego, po którym izolowano zarodki, wydaje się przypadkowa. Nie można przedstawić prawidłowości, która wskazywałaby jednoznacznie, po jakim czasie od zapylenia należałoby przeprowadzać izolację, aby osiągnąć optymalną efektywność kultur in vitro zarodków. Zhang i in. (2003) zauważyli, że prowadzone przez nich kultury zarodków mieszańcowych *B. napus* × *B. juncea* cechowały się lepszą regeneracją bezpośrednią w przypadku, gdy zarodki były izolowane w 15 dniu po zapyleniu. Natomiast izolacja zarodków w 10 dniu po zapyleniu prowadziła do wytwarzania kalusa przez zarodki. Momotaz i in. (1998) inkubowali zalążki pochodzące z krzyżowań pomiędzy różnymi gatunkami *Brassica* i *Sinapis* pomiędzy 15 a 20 dniem po zapyleniu. Chen i Wojciechowski (2000) jednoznacznie stwierdzili, iż izolację zarodków mieszańcowych należy przeprowadzić zanim zalążki zaczną degenerować wewnątrz łuszczyzny z powodu braku prawidłowego rozwoju bielma.

Wnioski

1. Wykorzystując kultury izolowanych zarodków, rośliny mieszańcowe uzyskano jedynie z kombinacji krzyżówkowych *B. napus* z genotypami *B. rapa*.
2. Najwyższa efektywność kultur zarodkowych mieszańców *B. napus* × *B. rapa* była dla *B. rapa* 2244/01 oraz dla odmiany Indus i wynosiła odpowiednio 13,22 i 11,05%.

Literatura

- Akbar M.D. 1987. Resynthesis of *Brassica napus* for earliness and day length insensitivity. Thesis, Swed. Univ. Agric. Sci., Uppsala, Sweden.
- Baetzel R., Friedt W., Voss A., Lühs H. 1999. Development of yellow seeded high erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.). 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia.
- Bartkowiak-Broda I. 2006. Kierunki hodowli rzepaku. Rzepak – biopaliwa. „Agro Serwis”, czerwiec 2006, dodatek specjalny. Wydawnictwo Biznes-Press.
- Bechyne M. 1987. Breeding and some biological properties of yellow seeded winter rapeseed (*Brassica napus*). Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, Poland, 2: 281-189.
- 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. Anim. Sci., 62, 557-565.
- Bengtsson L. 1985. Improvement of rapeseed meal quality through breeding for high protein content. Thesis, Swedish Univ. Agric. Sci., Svalöv, Sweden.
- 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.
- Chen Y., Wojciechowski A. 2000. Obtained interspecific hybrid of *B. napus* and *B. oleracea* var. *italica* by embryo and ovule *in vitro* culture. J. Huazhong Agric. Univ., 19: 274-278.
- Daun J.K., DeClerq D.R. 1988. Quality of yellow and dark seeds in *Brassica campestris* canola varieties Candle and Tobin. JAOCS, 65: 122-126.
- Getinet A. 1986. The inheritance of seed coat colour in *Brassica carinata* A. Brown and examination of seed quality parameters and their transfer from related species *B. juncea* L. Czern and Coss and *B. napus* L. M. Sc. Thesis, Univ. of Saskatoon, Canada.
- Häkanson A. 1956. Seed development of *Brassica oleracea* and *B. rapa* after certain reciprocal pollinations. Hereditas, 42: 373-376.
- Heath D.W., Earle D.E. 1997. Synthesis of low linolenic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) through protoplast fusion. Euphytica, 93: 339-343.
- Hutcheson D.S. 1984. Performance of varietal hybrids and relationship of seed size and colour with meal protein and crude fibre in *Brassica campestris* L. Ph. D. Thesis, Univ. of Saskatoon, Canada.
- Inomata N. 1967. Production of triploid hybrids of *Brassica* by embryo culture. Japan J. Breed., 27: 295-304.

- Jourdan P.S., Earle E.D., Mutschler M.A. 1989. Synthesis of male sterile, triazine resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile *B. oleracea* and atrazine resistant *B. campestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 445-455.
- 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.
- Karpechenko G.D. 1924. Hybrids of *Raphanus sativus* × *Brassica oleracea*. I. *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.
- Krzymański J. 2000. Perspektywy badań nad rzepakiem i jego hodowlą. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI, 1: 7-14.
- Liu H.L. 1983. Studies on the breeding of yellow seeded *Brassica napus* L. 6th Int. Rapeseed Congress, Paris, France, 1: 637-641.
- Liu H.L., Gao Y.T. 1987. Some fundamental problems conducted from the studies on the breeding of yellow seeded *Brassica napus* L. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress*, Poznań, Poland, 2: 476-491.
- Liu H.L., Han J.X., Hu X.J. 1991. Studies on the inheritance of seedcoat colour and other related characters of yellow-seeded *Brassica napus*. *Proc. 8th. Int. Rapeseed Congress*, Saskatoon, Canada, 1438-1444.
- Momotaz A., Kato M., Kakihara F. 1998. Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapis* species by means of embryo rescue techniques. *Euphytica*, 103: 123-130.
- Morinaga T. 1929. Interspecific hybridization in *Brassica*. *Cytologia*, 6: 62-67.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physid. 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.
- Nitsch J. P., Nitsch C., Hamon S. 1969. Production de *Nicotiana* diploids a partir de cals haploides cultives *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 269: 1275-1278.
- Olsson G. 1960. Species crosses within the genus *Brassica napus* L. II. Artificial *Brassica napus* L. *Hereditas*, 46: 351-396.
- Olsson G., Ellerstrom. 1980. Polyploidy breeding in Europe. In: Tsunoda K., Hinata K., Gomez-Campo C., (eds), *Brassica crops and Wild Allies*. Japan Science Society Press, Tokyo, Japan, 167-190.
- Ozminkowski R.H., Jourdan P. 1994. Comparing the resynthesis of *Brassica napus* (L.) by interspecific somatic and sexual hybridization. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 119: 808-823.
- 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 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 Anstrichmittel*, 87, 6: 235-237.
- Shwartz D. 1958. A new temperature resistance allele at the sticky locus in maize. *Heredity*, 49: 149-152.
- Stringam G.R., McGregor D.J., Pawłowski S.H. 1974. Chemical and morfological characteristics associated with seedcoat color in rapeseed. *Proc. 4th Int. Rapessed Conference*, Giessen, West Germany: 99-108.

- Szestowicka B., Spasibionek S., Krzymański J. 1995. Zastosowanie mieszańców międzygatunkowych pomiędzy *Brassica napus* i *Brassica carinata* w hodowli ulepszającej jakość rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVI (1): 63-68.
- Theander O., Aman P., Miksche G.E., Yasuda S. 1977. Carbohydrates, polyphenol and lignin in seed hulls of different colors from turnip rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 270-273.
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J. Bot.*, 7: 389-452.
- van Caseele L., Mills J.T., Sumner M. 1982. Cytological study of the palisade development in the seed coat of Candle canola. *Can. J. Bot.*, 60: 2469-2475.
- Vaughan J.G. 1970. Cruciferae. In: Vaughan J.G. (ed.), *The structure and utilization of oilseeds*. Chapman and Hall, London, 49-62.
- 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. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* L. I. Effectiveness of crossing, pollen tube growth, embryogenesis. *Genetica Polonica*, 26/4: 423-436.
- Woods D.L. 1980. Association of yellow seed coat colour with other characteristics in mustard (*Brassica juncea*). *Eucarpia Cruciferae Newsletter*, 5: 23-24.
- Zaman M.W. 1989. Inheritance of seed colour in *Brassica campestris*. *Sveriges Utsadesförenings Tidskrift*, 99: 205-207.
- Zhang G.Q., Zhou W.J., Gu H.H., Song W.J., Momoh E.J.J. 2003. Plant regeneration from the hybridization of *Brassica juncea* and *B. napus* through embryo culture. *J. Agronomy & Crop Science*, 189: 347-350.