

Andrzej Wojciechowski, Henryk Cichy*, Małgorzata Weigt

Akademia Rolnicza w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

* Zakład Doświadczalny Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Małyszynie

Wyniki obserwacji morfologicznych oraz analiz cytogenetycznych i chemicznych roślin o morfotypie rzepiku występujących na plantacjach rzepaku ozimego

Results of morphological, cytogenetical and chemical observations of plants of turnip rape morphotype which were found on oilseed plantations

Słowa kluczowe: rzepak, rzepik, chwasty, plantacje rzepaku, mieszańce międzygatunkowe

Key words: *Brassica napus*, *Brassica rapa*, weeds, rapeseed plantation, interspecific hybrids

W ostatnich latach zaobserwowano na plantacjach rzepaku ozimego występowanie innych roślin o morfotypie rzepiku. W związku z tym w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu scharakteryzowanie tych roślin, tak pod względem morfologicznym jak i cytogenetyczno-chemicznym. Do badań użyto materiał roślinny wykazujący podwyższoną zawartość kwasu erukowego (wg danych z Zakładów Tłuszczowych w Kruszwicy). W 1999 roku z 14 wytypowanych plantacji pobrano przed kwitnieniem po 10 roślin, które namnożono w warunkach całkowitej izolacji w hali wegetacyjnej. Nasiona zebrane z poszczególnych roślin po ich samozapyleniu posłużyły do otrzymania kolejnej generacji roślin w szklarniach. Na roślinach tych wykonano obserwacje morfologiczne oraz analizy podziałów mitotycznych i mejotycznych. Spośród 14 analizowanych plantacji, tylko w przypadku dwóch roślin wykazywały podobieństwo morfologiczne do rzepaku. Somatyczna liczba chromosomów, jaką obserwowano w stożkach wzrostu roślin z tych dwóch plantacji wyniosła w jednym przypadku $2n = 29$, a w drugim $2n = 28-31$. Rośliny pochodzące z pozostałych plantacji

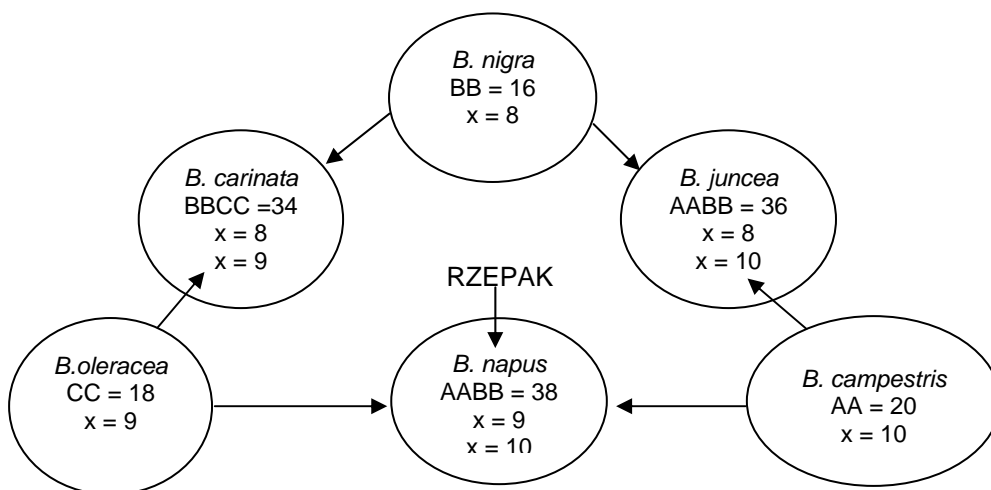
In the last few years the existence of other plants of cruciferous species on oilseed rape plantations was observed. Therefore the investigations concerning morphological, chemical and cytogenetical characteristics were undertaken. The observed plant material was collected from the fields on which sample of seeds contained higher amount of erucic acid and glucosinolates (according to the data from Kruszwica Oil Company). In 1999 ten plants were collected from each of 14 chosen plantations. These plants were self-pollinated. The seeds collected from these plants were sown in the glasshouse, where observations of morphological traits and mitotic and meiotic divisions were made. Among 14 analysed plantations, only plants from two of them were similar to oilseed rape and they had $2n = 29$ or $2n = 28-31$ chromosomes. The plants from the rest 12 plantations were similar to turnip rape and they showed $2n = 20$ chromosomes during mitosis and regular conjugation into 10 bivalents during meiosis. The obtained results allow to conclude that most of the observed plants are turnip rape or segregants from spontaneous hybrids oilseed rape \times turnip rape.

wykazywały morfotyp rzepiku, a w ich komórkach stożków wzrostu korzenia obserwowano $2n = 20$ chromosomów oraz w mejozie regularną koniugację w 10 biwalentów. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że analizowane rośliny są w większości przypadków najprawdopodobniej rzepikiem lub też są segregantami mieszańców powstałych w wyniku spontanicznego krzyżowania się rzepaku z rzepikiem. Inne możliwe pochodzenie tych roślin to powstanie tzw. powrotnych diploidów, które wysegregowały z tetraploidalnych populacji *Perko* (tetraploidalne mieszańce pomiędzy rzepikiem i kapustą chińską lub pekińską).

Another explanation of origin of these plants is that they are so called returned diploids which segregated from tetraploids of *Perko* (tetraploid hybrids between turnip rape and Chinese or Pekinese cabbage).

Wstęp

Rodzina *Brassicaceae* obejmuje gatunki diploidalne i gatunki alloploidalne (rys. 1). Prace badawcze prowadzone w pierwszej połowie dwudziestego wieku wykazały, że gatunki alloploidalne o wyższej liczbie chromosomów powstały z gatunków diploidalnych. Rzepak (*Brassica napus*, genomy AACC = 38) jest naturalnym allotetraploidem łączącym w sobie podstawowe zespoły chromosomów *B. campestris* (AA = 20) i *B. oleracea* (CC = 18).



Rys. 1. Schemat obrazujący powstanie gatunków alloploidalnych z gatunków diploidalnych (U 1935) — Triangle (U 1935) showing the creation of allopolyploid species from diploid ones

Próby otrzymania syntetycznego rzepaku poprzez generatywne krzyżowanie gatunków wyjściowych były przeprowadzane z różnym skutkiem. Praktyczną miarą możliwości krzyżowania się różnych form jest procentowo wyrażony stosunek liczby uzyskanych mieszańców (M) do liczby zapylnych kwiatów (K). Z danych literaturowych wynika, że M/K kształtował się w zakresie od 0,0% (Sarashima 1964) do 38,75% (Matsuzawa 1978) w przypadku kombinacji krzyżowań, w których rośliny *B. campestris* użyto jako formy macecznej i w zakresie od 0,0% (Olsson 1960) do 3,2% (Röbbelen 1966) w krzyżowaniach, gdzie formą maceczną były rośliny *B. oleracea*.

Odrębnym zagadnieniem jest możliwość otrzymywania tzw. mieszańców „pół-syntetycznych” poprzez krzyżowanie rzepaku (*B. napus*) z gatunkami wyjściowymi (*B. campestris* lub *B. oleracea*) do których należy między innymi rzepik (*B. campestris* ssp. *oleifera*). Z danych publikowanych przez Grabca (1967) oraz na podstawie własnych obserwacji (Wojciechowski — dane nie publikowane) wynika, że ten typ krzyżowań w znacznie większym stopniu umożliwia otrzymanie mieszańców, w porównaniu z krzyżowaniem gatunków podstawowych, przy czym efektywniejsze są krzyżowania, w których jako formy macecznej używa się roślin rzepaku.

W ostatnich kilku latach pojawiają się coraz częstsze doniesienia z różnych krajów o zanieczyszczeniu plantacji rzepaku roślinami wyrosłymi z nasion rzepaku, które osypały się w poprzednich latach. Nasiona te zachowują żywotność nawet do siedmiu lat (Smith i in. 1995) i tym samym mogą przyczynić się do pogorszenia jakości surowca dostarczanego dla potrzeb przemysłu tłuszczowego. W Polsce w ostatnich latach przedstawiciele przemysłu tłuszczowego donoszą o obniżeniu się jakości nasion rzepaku pozyskiwanych z niektórych plantacji w różnych rejonach kraju. Gorsza jakość skupowanego surowca była dość często powiązana z występowaniem w uprawach rzepaku innych roślin krzyżowych, które w wielu przypadkach morfotypem przypominały rzepik. (Uwaga redakcji: należy wziąć pod uwagę możliwość obcozapylenia). Problem ten jest o tyle poważny, że nasiona obcych gatunków krzyżowych są zbierane łącznie z nasionami rzepaku, co obniża jakość surowca rzepakowego. W związku z tym w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu scharakteryzowanie tych roślin, tak pod względem morfologicznym, jak i cytogenetyczno-chemicznym.

Material i metody

Wiosną 1998 roku w rejonach byłego województwa gorzowskiego, z których Zakłady Tłuszczowe z Kruszowicy skupiły surowiec o podwyższonej zawartości kwasu erukowego, wytypowano kilkanaście plantacji dla przeprowadzenia dokładniejszych obserwacji.

Obserwacje prowadzone na wytypowanych polach potwierdziły występowanie roślin o wyglądzie typowym dla rzepiku. Rozmieszczenie tych roślin na

polach rzepakowych było we wszystkich przypadkach placowe, a liczebność tych placów była różna w zależności od obserwowanej plantacji. Rośliny o innym niż rzepak morfotypie najczęściej rosły poza rzędami i były łatwo zauważalne, szczególnie na plantacjach o szerokich międzyrzędziach.

W okresie poprzedzającym kwitnienie z wytypowanych plantacji wykopano po 10 roślin typowych dla odmiany wysianej na danym polu i 10 roślin o morfotypie odmiennym od rzepaku. Rośliny te wysadzono w hali vegetacyjnej ZDHR Małyszyn i w okresie kwitnienia zaizolowano włókniną. Nasiona zebrane z zaizolowanych kwiatostanów posłużyły do otrzymania następnej generacji roślin, które rosły w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu. Na roślinach tych wykonano obserwacje dotyczące:

- ustalenia liczby chromosomów w komórkach somatycznych i generatywnych,
- oceny żywotności i wielkości ziaren pyłku (ZP),
- oceny stopnia samozgodności,
- opisu cech morfologicznych.

Analizę chromosomów przeprowadzano w preparatach mitotycznych i w preparatach mejotycznych. Dla analiz mitoz utrwalano korzonki pochodzące z roślin rosnących w doniczkach. Z tych samych roślin utrwalano pąki kwiatowe dla obserwacji podziałów mejotycznych. W obu przypadkach obiekty utrwalano w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoya (6:3:1). Chromosomy mitotyczne barwiono przy pomocy 4% nigrozyny, a chromosomy mejotyczne przy pomocy 2% orceiny.

Żywotność i wielkość ziaren pyłku określano w preparatach wykonanych przy użyciu płynu Bellinga.

Stopień samozgodności ustalono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego na podstawie obserwacji kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu słupka oraz stopnia wnikania łagiewek pyłkowych w poszczególne części słupka. W tym celu słupki utrwalano w utrwalaczu Carnoya po 24 i 48 godzinach od momentu samozapylenia. Macerację słupków wykonano przy użyciu 1 N NaOH, a do ich wybarwienia zastosowano błękit aniliny z dodatkiem K_3PO_4 .

Przy opisie cech morfologicznych uwzględniono wielkość kwiatów, kształt i barwę liści oraz obecność lub brak włosków po dolnej stronie liścia. Cechy te uwzględniono przy kwalifikowaniu analizowanych roślin na typ rzepakowy (RZ) lub rzepikowy (R).

Wyniki i dyskusja

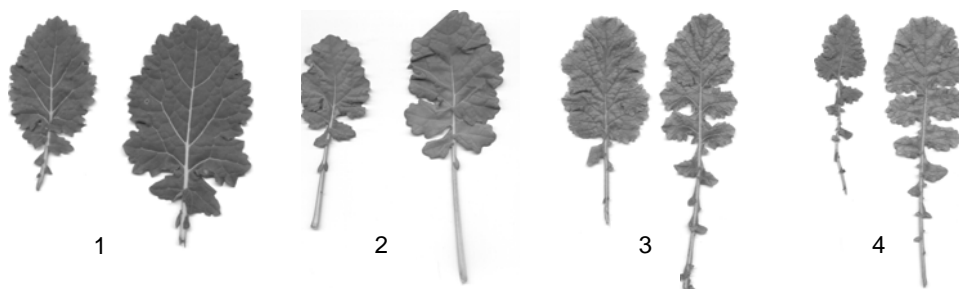
Rośliny o morfotypie rzepiku zakwitły w warunkach polowych o 3 do 10 dni wcześniej od rzepaku. Posiadały one więcej odgałęzień bocznych w porównaniu z rzepakiem, co czyniło ich wygląd bardziej krzaczasty. W kwiatostanach tych roślin kwiaty rozwinięte były usytuowane powyżej nierozwiniętych pąków kwiatowych, a liście były jasnozielone i u nasady obejmowały łodygę.

W warunkach hali wegetacyjnej ZDHAR Małyszyn rośliny kwitły obficie. Nasiona zebrane z zaizolowanych kwiatostanów były wyraźnie mniejsze w porównaniu z nasionami rzepaku i ich MTN zawierała się w przedziale od 2,98 do 4,36 g. Jesienią 1999 roku nasiona zebrane z izolowanych kwiatostanów wysiano w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu. Wyrosłe z nich rośliny jaryzowano w warunkach naturalnych i w połowie stycznia ponownie umieszczono w szklarni. Każda plantacja reprezentowana była przez 4 rośliny, które były potomstwem tej samej rośliny matecznej. Jedynie w przypadku plantacji P-7 (tab. 1) analizowano potomstwa dwóch roślin matecznych (a i b). Spośród 14 analizowanych plantacji tylko rośliny z plantacji X-3 nie zakwitły, pomimo że były jaryzowane w takich samych warunkach jak rośliny potomne z pozostałych 13 plantacji.

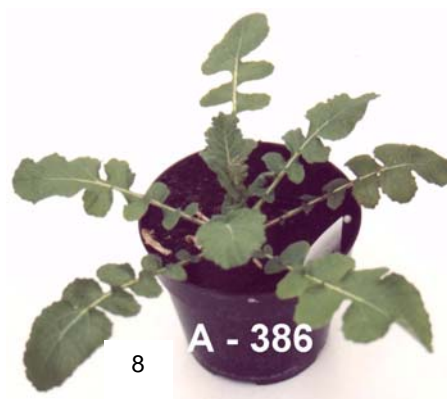
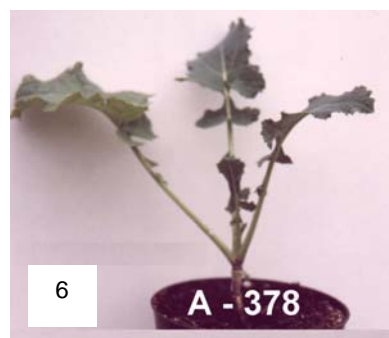
Ważniejsze cechy charakteryzujące analizowany materiał zestawiono w tabeli 1. W tabeli tej morfotyp roślin rzepakowy (RZ) (fot. 1, 2, 5 i 6) lub rzepikowy (R) (fot. 3, 4, i 7–10) określono na podstawie kształtu i barwy liścia, obecności włosków na powierzchni blaszki liściowej i sposobu kwitnienia. Za typ rzepikowy przyjmowano rośliny, których liście posiadały brzeg blaszki liściowej głęboko wcinany i u nasady prawie całkowicie obejmowały łodygę. Liście tych roślin na powierzchni posiadały włoski, a nalot woskowy był wyraźnie słabszy w porównaniu z liśćmi rzepaku. Barwa liści była jasnozielona. Jak można zauważyć w tabeli 1, morfotyp roślin wyjściowych (bezpośrednio pobranych z plantacji rzepaku) w przypadku 10 spośród 14 analizowanych plantacji był zgodny z tym jaki obserwowano w ich potomstwie. W trzech przypadkach, tj. plantacje P-1, P-12 i P-14, rośliny wyjściowe były w typie rzepaku, a rośliny potomne otrzymane w wyniku ich samozapylenia reprezentowały typ rzepikowy. W przypadku plantacji P-7, która reprezentowana była przez dwa różne potomstwa, jedno z potomstw było w typie rzepaku, a drugie w typie rzepiku, pomimo że oba pochodziły z roślin będących w typie rzepiku.

Analizy mitoz i mejoz wykazały, że rośliny znakomitej większości potomstw posiadały charakterystyczną dla rzepiku liczbę chromosomów, $2n = 20$ (fot. 11 i 13–17). Tylko w przypadku dwóch potomstw, tj. z plantacji P-7 potomstwo „a” i z plantacji X-3, rośliny wykazywały odmienne liczby chromosomów. U roślin z plantacji P-7 dokładna liczba chromosomów była trudna do ustalenia, ale była ona znacznie wyższa od 20 i mieściła się w zakresie 28–31 chromosomów. Godnym podkreślenia jest fakt, że w podziałach mejotycznych tych roślin nie obserwowano większych zaburzeń poza faktem, że komórki archesporialne trwały stosunkowo długo w stadium profazy pierwszej i prawdopodobnie większość z nich nie kończyła podziału mejotycznego. Skutkiem tego u roślin tych obserwowano znaczne obniżenie płodności ziaren pyłku (poniżej 60%), a te które były żywotne, były wyraźnie większe w porównaniu z ziarnami pyłku pozostałych roślin. Pod względem morfotypu rośliny te były podobne do rzepaku i pomimo niskiej żywotności ziaren pyłku wykazywały wysoki stopień samozgodności, co zostało potwierdzone wynikami z obserwacji kiełkowania łagiewek pyłkowych (fot. 18) i stopnia wiązania łuszczyń.

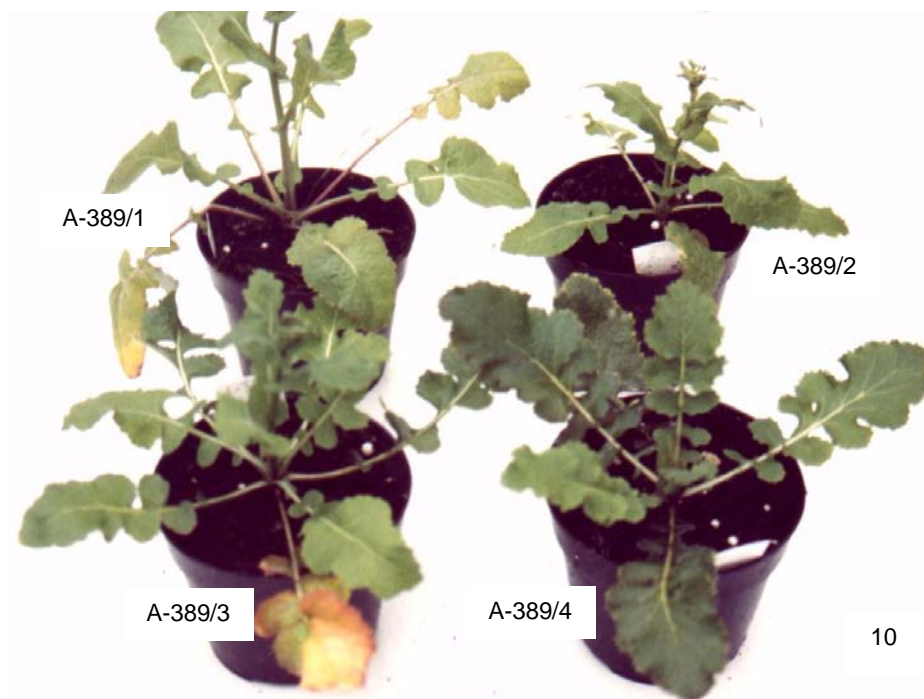
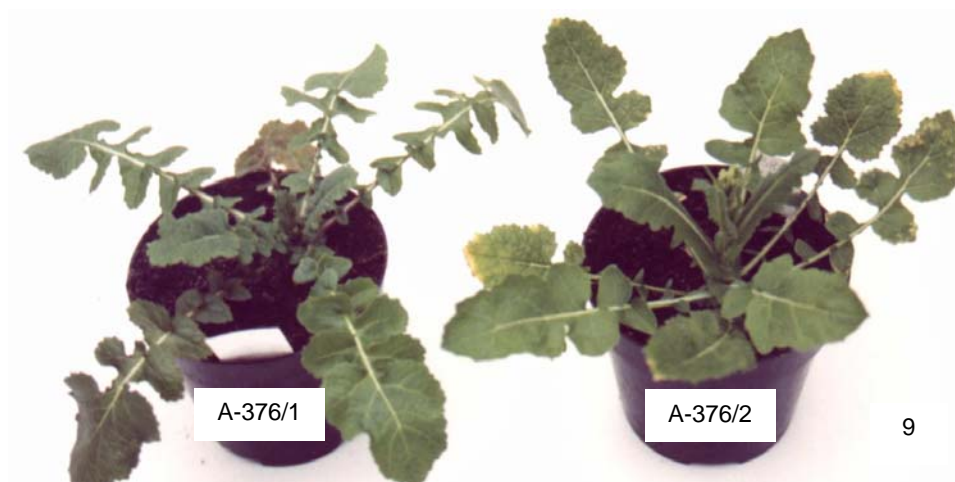
Tabela 1 pozioma



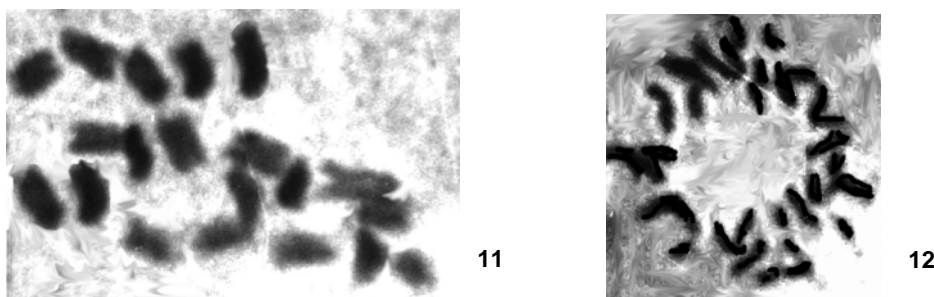
Fot. 1–4. Kształty liści roślin rzepaku (1) i roślin potomnych otrzymanych w wyniku samozapylenia roślin *Brassica* znalezionych na plantacjach rzepaku: 2 — roślina 8001, 3 — roślina A-371, 4 — roślina A-374 — *Shapes of leaves of oilseed rape plant (1) and progeny plants (2–4) obtained after self-pollination of Brassica plants found in oilseed rape plantations: 2 — plant 8001, 3 — plant A-371, 4—plant A-374*



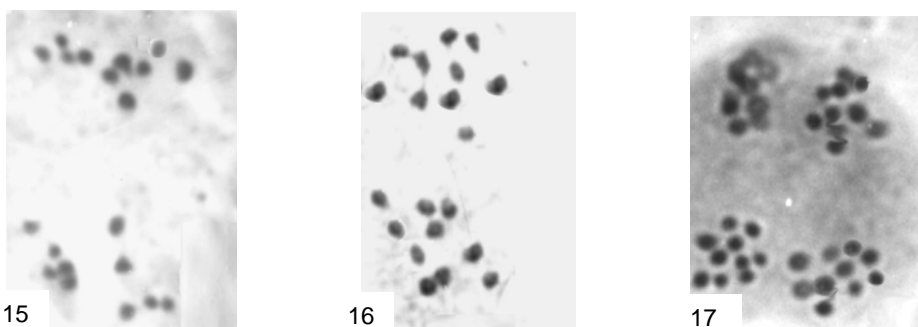
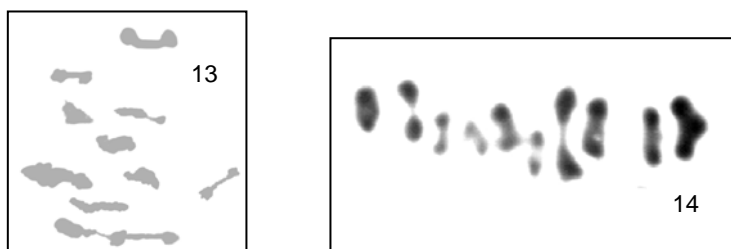
Fot. 5–8. Rośliny w stadium rozety, 5–6 — rośliny 8001 i A-378 w typie rzepaku, 7–8 — rośliny A-376 i A-386 w typie rzepiku — *Plants in the rosette stage of development; 5–6 — plants 8001 and A-378 representing morphotype of oilseed rape; 7–8 — plants A-376 and A-386 representing morphotype of turnip rape*



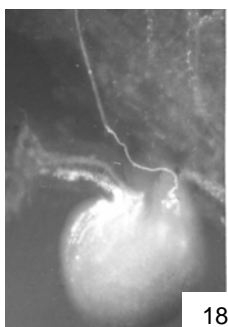
Fot. 9–10. Potomstwa roślin A-376 (9) i A-389 (10) — *Progenies of plants A-376 (9) and A-389 (10)*



Fot. 11–12. Płytki metafazalne: 11 — roślina A-370 z $2n = 20$ chromosomów, 12 — roślina 8001 z $2n = 29$ chromosomów — *Metaphase plates: 11 — plants A-370 with $2n = 20$ chromosomes, 12 — plant A-8001 with $2n = 29$ chromosomes*



Fot. 13–17. Mejoza w potomstwie samozapylnych roślin znalezionych na plantacjach rzepaku: 13 — diakineza z 10_{II} (roślina A-373), 14 — M-I z 10_{II} (A-382), 15–16 — A-I, po 10 chromosomów na biegunach u roślin A-376 i A-384, 17 — A-II, po 10 chromosomów na biegunach, roślina A-392 — *Meiotic division in progenies of plants found in the oilseed rape fields: 13 — diakinesis with 10_{II} (plant A-373), 14 — M-I with 10_{II} , (plant A-382), 15–16 — A-I, poles with 10 chromosomes, plant A-376 and A-384, 17 — A-II, poles with 10 chromosomes, plant A-392*



Fot. 18. Łągiewka pyłkowa w mikropyle u rośliny A-378/1 — *Pollen tube in the micropyle of plant A-378/1*

Rośliny potomne z plantacji X-3 były w typie rzepaku i pochodziły z roślin o takim samym morfotypie. Pomimo długiego okresu ich jaryzowania do tej pory nie zakwitły. Obserwacje chromosomów podczas podziałów mitotycznych w komórkach merystematycznych stożka wzrostu korzenia wykazały, że rośliny te posiadały $2n = 29$ chromosomów (fot. 12). Najprawdopodobniej rośliny te są potomstwem mieszańca powstałego ze skrzyżowania się rzepaku z rzepikiem ($AAC = 29$).

Wysoka zawartość kwasu erukowego i glukozynolanów oraz liczba chromosomów $2n = 20$ jaką obserwowano u roślin wyjściowych przemawia za tym, że jest to najprawdopodobniej rzepik, chociaż inna hipoteza co do pochodzenia tych roślin jest również dopuszczalna. Wskazuje na to fakt, że niektóre potomstwa w typie rzepiku pochodziły z roślin będących w typie rzepaku, które wykazywały brak kwasu erukowego (plantacje P-1 i P-12). Są to być może segreganty mieszańców, które powstały w wyniku spontanicznego krzyżowania się rzepaku z rzepikiem. W pracy nad mieszańcami oddalonymi w obrębie rodzaju *Brassica*, jeden z autorów tej pracy (Wojciechowski 1985a i b) obserwował, że nawet w przypadku pełnej syntezy (*B. campestris* × *B. oleracea*) mieszańce F_1 prezentowały typ rzepaku (*B. napus*), a krzyżowania półsyntetyczne (*B. napus* × *B. oleracea* lub *B. campestris*) dawały w potomstwie rośliny mieszańcowe reprezentujące morfotyp mniej lub bardziej zbliżony do rzepaku bądź rzepiku. Z kolei Grabiec (1967) w swej obszernej pracy nad mieszańcami oddalonymi w obrębie rodzaju *Brassica* wykazał, że w warunkach kontrolowanych rzepak stosunkowo łatwo krzyżuje się z rzepikiem w obu kierunkach. Pomimo, że krzyżowanie się tych dwóch gatunków w warunkach kontrolowanych nie stanowi większego problemu, to w warunkach polowych większą szansę przetrwania mają mieszańce z kierunku krzyżowań rzepak × rzepik niż mieszańce z krzyżowań rzepik × rzepak.

Ze względu na to, że wśród czterech roślin każdego z analizowanych potomstw obserwowano segregację pod względem głębokości wcięć blaszki liściowej oraz zróżnicowanie intensywności zabarwienia (pomimo, że generalnie był to typ rzepikowy) i szorstkości liścia (fot. 9–10), nie może być wykluczonym pochodzenie tych roślin jako pozostałości po uprzednio uprawianych na tych terenach pastewnych form *Brassica*, tj. *Perko* lub *Brachina*. Obie te formy były tetraploidalne ($2n = 4x = 40$) i powstały w wyniku krzyżowania rzepiku ozimego (*B. campestris* ssp. *oleifera*) z kapustą chińską (*B. campestris* ssp. *chinensis*). W przypadku *Brachina* ostateczne jej ukształtowanie jako rośliny pastewnej nastąpiło po skrzyżowaniu mieszańców F_1 *oleifera* × *chinensis* z *B. narinosa*. Niewykluczone jest więc, że pojawiające się obecnie na plantacjach rzepaku formy rzepikowe są tzw. powrotnymi diploidami, które wysegregowały z tetraploidalnych form *Perko* bądź *Brachina*. Podobne zjawisko obserwował Kasperek w swych pracach nad poliploidami u grochu (*Pisum sativum*) (informacja ustna — dane nie publikowane), gdzie w ósmym pokoleniu od zastosowania zabiegu kolchicy-

nowania (M_8) formy stwierdzone uprzednio jako tetraploidalne później okazały się diploidalne. Za hipotezą, że analizowane rośliny znajdujące na plantacjach rzepaku mogą być powrotnymi diploidami może przemawiać również fakt występowania niskiego stopnia samozgodności, określony na podstawie obserwacji kiełkowania łagiewek pyłkowych oraz stopnia wiązania łuszczyn przy samozapyleniu. Stąd też dla całkowitego wyjaśnienia tego problemu nieodzowne są dalsze, bardziej szczegółowe badania.

Literatura

- Grabiec B. 1967. Badania nad mieszańcami oddalonymi u *Brassica*. Hodowla i Aklimatyzacja Roślin 11/2: 179-234.
- Matsuzawa Y. 1978. Studies on the interspecific hybridization in genus *Brassica*. Japan J. Breed. 28: 186-196.
- Olsson G. 1960. Species crosses within the genus *Brassica*. I. Artificial *Brassica napus* L. Hereditas 46/3-4 351-386
- Röbbelen G. 1966. Beobachtungen bei interspezifischen *Brassica* Kreuzungen, insbesondere über die Entstehung matromorpher F_1 – Pflanzen. Angew. Bot. 39: 205-221.
- Sarashima M. 1964. Studies on the breeding of artificially synthesised rape (*Brassica napus*). I. F_1 hybrids between *B. campestris* group and *B. oleracea* group and the derived F_2 plants. Japan. J. Breed. 14: 226-237.
- Smith J.M., Froment M.A. 1995. A survey of management practices and the rotational position of high erucic acid rape (HEAR). Proc. of 9th Int. Rapeseed Congress, F-33, Cambridge, England.
- U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special references to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. Japan. J. Bot. (cytat za Olsson 1960).
- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea*. I. Effectiveness of crossing. Pollen tubes growth. Embryogenesis. Genetica Polonica 29: 1-34.
- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea*. II. Morphological traits. Somatic chromosome number. Meiotic division and microsporogenesis. Genetica Polonica 29: 35-45.