

Andrzej Wojciechowski, Justyna Bloch

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

Obserwacje cech morfologicznych oraz mikro- i makrosporogenezy u mieszańców F₁ *Brassica napus* × *B. carinata* zdrowych i zainfekowanych fitoplazmami w porównaniu z formami wyjściowymi

The observation of morphological traits and micro- and
macrosporogenesis in F₁ of distant hybrids *Brassica napus* × *B. carinata*:
Comparison of healthy plants and phytoplasmas infected plants
with parental plants

Słowa kluczowe: krzyżowanie oddalone, fitoplazmy, in vitro, mikrosporogeneza, makrosporogeneza

Doświadczenie założono w 2005 r. na polach doświadczalnych — Poznań, Dłoń i w warunkach szklarniowych. W prezentowanej pracy analizowano tylko mieszańce F₁ z krzyżowania MS-8 *B. napus* × *B. carinata*, gdyż w jednej z trzech lokalizacji (pole w Poznaniu) rośliny mieszańcowe były całkowicie porażone przez fitoplazmy. U tych roślin oraz u form wyjściowych analizowano procesy mikro- i makrosporogenezy.

Morfotyp roślin pokolenia F₁ w stadium rozety w niektórych przypadkach był podobny do roślin matecznych, a w innych był pośredni pomiędzy roślinami rodzicielskimi. W fazie kwitnienia różnice pomiędzy mieszańcami były mniejsze i były one bardziej podobne do rośliny matecznej.

Wszystkie mieszańce były męskosterylne (podobnie jak forma mateczna), a ich kwiaty były pośrednie pomiędzy formami wyjściowymi. Główną przyczyną sterility pyłku były zaburzenia występujące w mejozie i podczas rozwoju tapetum.

Rośliny zainfekowane fitoplazmami wykazywały bardzo dużą deformację kwiatów. Słupki posiadały znamiona podzielone na 2–3 części. Płatki korony i działki kielicha były zdeformowane i zabarwione na kolor zielony. W komorach pylnikowych kształtował się archespor, którego komórki w większości przypadków nie wchodziły w proces mejozy. Powstałe po mejozie ziarna pyłku zamierały. Przyczyną tego zamierania było zbyt słabo rozwinięte tapetum. W zalążkach obserwowano jedynie komórki archesporialne, które nie podejmowały mejozy.

Key words: wide crosses, phytoplasmas, in vitro, microsporogenesis, macrosporogenesis

The experiment was settled in 2005 in the field in two different locations (Poznań and Dłoń) and in greenhouse conditions. In this paper only F₁ plants from the crossing MS-8 *B. napus* × *B. carinata* were analysed because they were completely infected with phytoplasmas in one of three locations (in the field in Poznań). In these plants and in initial forms micro- and macrosporegenesis were analysed.

The morphology of F₁ plants at the rosette stage was in some cases similar to the paternal czy parental? forms and in some cases it was intermediate between parents. The differences between particular hybrids were lower at flowering stage and they were more similar to maternal form.

All interspecific hybrids were male sterile and their flowers were smaller compared to parental forms. The main reason of pollen sterility were disturbances in meiosis and during tapetum development.

All plants infected by phytoplasmas showed big malformation of flowers. The pistils had stigmas divided into 2–3 parts. The sepals and petals were green and their shape was deformed. In the anther chamber there was normal archespor but after meiosis the pollen grains were aborted. The reason of that abortion was not sufficient development of tapetum. In the ovules only archespor cell was observed and there were no meiotic divisions.

Wstęp

Wzrastające wymagania rynku konsumenckiego stawiają przed hodowcami roślin ciągle nowe wyzwania. Sprostać tym wyzwaniom można poprzez kreowanie nowych, lepszych odmian roślin uprawnych. Tworzenie nowych odmian opiera się w głównej mierze na korzystaniu z szeroko rozumianej genetycznej zmienności cech. Im większa jest ta zmienność, tym łatwiej można osiągnąć zakładane cele hodowlane. Zakres zmienności cech można zwiększać między innymi poprzez mutagenezę i krzyżowanie. W przypadku wielu gatunków roślin, w tym między innymi rzepaku (*B. napus*), krzyżowanie wewnątrzgatunkowe nie wystarcza, aby stworzyć genotyp lepszy od tego, który już znajduje się w uprawie. Z tego powodu obserwuje się rosnące zainteresowanie pracami genetyczno-hodowlanymi nad uzyskaniem mieszańców oddalonych, będących cennym materiałem wyjściowym dla hodowli roślin.

Hodowla rzepaku ozimego nie skupia się jedynie na poprawie plonowania. Znaczącą rolę odgrywa również poszerzenie możliwości wykorzystania nasion poprzez modyfikację składu kwasów tłuszczowych i obniżenie zawartości związków antyżywnościowych. Ważny przedmiot badań stanowi obniżanie zawartości włókna surowego w okrywie nasiennej, dzięki czemu można uzyskać wzrost zawartości oleju i białka w nasionach. Te cechy związane są z żółtym kolorem nasion, który występuje naturalnie u wielu gatunków z rodzaju *Brassica*, lecz nie u *B. napus*. Głównym sposobem przeniesienia tej cechy do rzepaku może być krzyżowanie oddalone rzepaku z gatunkami o żółtym lub brązowym zabarwieniu nasion (Chen i in. 1988, Rahman i in. 2001, Ochodzki i Piotrowska 2002).

Tego typu krzyżowania rozpoczęto w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu w 2004 roku. Wykonane krzyżowania pomiędzy otrzymaną w Katedrze męskosterylną linią rzepaku ozimego MS-8 a czterema gatunkami *Brassica* o żółtych i brązowych nasionach, tj. *B. campestris* ssp. *sarson*, *B. campestris* ssp. *pekinensis*, *B. carinata* i *B. hirta* (*S. alba*) umożliwiły otrzymanie mieszańców z trzech spośród czterech kombinacji krzyżowań. Mieszańców nie

otrzymano w przypadku, gdy formę ojcowską stanowiła *B. hirta* (Wojciechowski, Lewandowska 2006).

W związku z tym, że jedynie rośliny mieszańcowe powstałe w wyniku krzyżowania *B. napus* var. *oleifera* z *B. carinata* cechowały się całkowitym porażeniem przez fitoplazmy w jednej z trzech lokalizacji eksperymentu, w prezentowanej pracy oceniano cechy morfologiczne oraz przebieg mikro- i makrosporoogenezy u oddalonych mieszańców pokolenia F₁ powstałych w wyniku tego krzyżowania, w porównaniu z formami wyjściowymi.

Material roślinny i metodyka pracy

Material, który posłużył do badań stanowiły mieszańce pokolenia F₁ jednej spośród trzech kombinacji krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*, z których otrzymano nasiona, tj. MS-8 *B. napus* var. *oleifera* f. *biennis* (męskosterylna linia rzepaku ozimego MS-8, 2n = AACCC = 38) × *B. carinata* (gorczyca etiopska, 2n = BBCC = 34). Powodem wykonania dokładniejszych obserwacji mieszańców z tej kombinacji krzyżowania było ich całkowite porażenie przez fitoplazmy w jednej z trzech lokalizacji eksperymentu. Mieszańce z pozostałych dwóch kombinacji krzyżowań, tj. MS-8 *B. napus* × *B. campestris* ssp. *sarson* (żółtonasienny rzepik jary, 2n = AA = 20) i MS-8 *B. napus* × *B. campestris* ssp. *pekinensis* (kapusta pekińska, 2n = AA = 20) były całkowicie wolne od fitoplazm.

Męskosterylna linia MS-8 została wyselekcjonowana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Poznaniu w pokoleniu F₈ międzygatunkowych mieszańców powstałych z krzyżowania *B. oleracea* var. *gemmifera* L. (brukselka) z *B. campestris* ssp. *chinensis* (kapusta chińska) (Wojciechowski 1993). Pozostałe gatunki użyte do krzyżowania otrzymano z banku genów Horticulture Research International w Wellsbourne, Anglia.

Eksperyment założono w 2005 roku na polu doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin w dwóch lokalizacjach: na Sołacz w Poznaniu i w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Dłóń oraz w warunkach szklarniowych.

Z kombinacji krzyżowania linii MS-8 *B. napus* × *B. carinata* analizowano 15 potomstw mieszańcowych, które powstały w wyniku zapylania 15 roślin linii MS-8 pyłkiem roślin *B. carinata*. Każde mieszańcowe potomstwo F₁ reprezentowane było przez minimum 30 roślin w każdej z trzech lokalizacji. Nasiona siano do doniczek w szklarni i część roślin w fazie trzech liści wysadzono na poletkach doświadczalnych Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu i w RGD Dłóń, w rozstawie 35 cm między rzędami. W Poznaniu doświadczenie założono na glebie płowej, klasy bonitacyjnej IIIb kompleksu żytniego dobrego, a w Dłoni na glebie płowej, klasy bonitacyjnej II kompleksu pszenno dobrego.

W szklarni rośliny rosły w doniczkach na podłożu ogrodniczym (mieszanka torfu i ziemi uprawnej w stosunku 1 : 1).

W całym cyklu badawczym wykonano obserwacje dotyczące oceny:

- 1) cech morfologicznych roślin w stadium rozety,
- 2) cech morfologicznych roślin w stadium kwitnienia,
- 3) procesu mitozy,
- 4) procesu mikro- i makrosporogenezy oraz analizy zmian morfologiczno-rozwojowych kwiatów roślin zaatakowanych przez fitoplazmy w oparciu o metodę parafinową.

Podczas obserwacji cech morfologicznych roślin F_1 w stadium rozety analizowano: kolor liści, stopień ich owłosienia, stopień pokrycia liścia warstwą woskową, obecność lub brak międzywęźli i przebarwień antocyjanowych. Określano podobieństwo roślin mieszańcowych do rodziców oraz segregację cech wewnątrz każdej kombinacji. Obserwacje te wykonano metodą opisową. Obserwacje cech morfologicznych roślin w stadium kwitnienia obejmowały charakterystykę morfologiczną kwiatów: długość i szerokość płatków korony, długość czterech większych pręcików i słupka, kolor płatków korony. Obserwacje wykonano na roślinach pokolenia F_1 oraz na formach rodzicielskich, mierząc po 5 losowo wybranych kwiatów z każdej rośliny.

Do analizy procesu mitozy pobrano korzonki z 3 roślin z każdego potomstwa. Korzonki pobierano bezpośrednio z doniczek i umieszczano w próbkach z lodowatą wodą na 8 godzin i następnie utrwalono w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoya (6 : 3 : 1). Preparaty wykonano zmodyfikowaną metodą nigrozynową. Macerację wykonano w mieszaninie 95% alkoholu etylowego i stężonego HCl w stosunku 2 : 1, przez 10–15 minut. Następnie korzonki płukano w lodowatej wodzie destylowanej przez 30 minut i barwiono przez 1 minutę w kropli 4% nigrozyiny rozpuszczonej w alkoholu (Wojciechowski — nie publikowane).

W celu analizy procesu mejozy u roślin pokolenia F_1 pobrano pąki kwiatowe z 3 losowo wybranych roślin z każdego potomstwa, od najmniejszego do największego i utrwalono je w zmodyfikowanym utrwalaczu Carnoya (6 : 3 : 1). Preparaty rozmazowe wykonano według metody orceinowej (Filutowicz, Kuźdowicz 1951). Analizując proces mejozy zwracano uwagę na występowanie lub brak zaburzeń, ich rodzaj w poszczególnych stadiach mejotycznych oraz cechy morfologiczno-rozwojowe komórek tapetum.

Zmiany morfologiczno-rozwojowe kwiatów roślin zainfekowanych przez fitoplazmy analizowano w oparciu o zmodyfikowaną metodę parafinową (Filutowicz, Kuźdowicz 1951, Wojciechowski 1985). W tym celu pobrano zniekształcone pąki kwiatowe z 10 roślin z każdego potomstwa mieszańcowego oraz jako kontrolę pąki bez zniekształceń z 3 roślin mieszańcowych tej samej kombinacji, 3 roślin linii matecznej (MS-8) i 3 roślin *B. napus* Lisek. Do wykonania trwałych preparatów wybrano po 5 pąków z każdej rośliny, od najmniejszego — (długość 2 mm), po-

przez pośrednie (3, 4, i 5 mm długości) do największego (pąki o pękających działkach kielicha). Obiekty zatopione w parafinie (62°C), po odpowiednim ułożeniu i uformowaniu bloczka cięto na mikrotomie, na skrawki grubości 9 µm w przypadku pąków małych (2 i 3 mm pąki) i 12 µm w przypadku pąków większych.

Analizując trwałe preparaty zwracano szczególną uwagę na:

- proporcje długości szyjki słupka do długości załąźni,
- cechy morfologiczne znamienia słupka (znamię całkowite czy podzielone),
- liczbę załążków,
- proces mikro- i makrosporogenezy,
- cechy morfologiczno-rozwojowe komórek tapetum.

Wyniki

Charakterystyka cech morfologicznych roślin mieszańcowych pokolenia F₁ MS-8 *B. napus* × *B. carinata* w stadium rozety

Analizę cech morfologicznych wykonano na 461 roślinach pochodzących z 15 potomstw mieszańcowych. Wszystkie rośliny mieszańcowe z tej kombinacji krzyżowania charakteryzowały się występowaniem antocyjanowych (fioletowych) przebarwień w dolnej części łodygi i na nowo wyrastających liściach. Pod względem tej cechy całe pokolenie mieszańców F₁ podobne było do formy ojcowskiej. Rośliny wewnątrz 9 potomstw nie różniły się od siebie, ich liście były ogonkowe, pierzastosieczne, miały kolor ciemnozielony, gruby woskowy nalot i brak owłosienia, czym upodobniły się do formy matecznej. Mieszańce w pozostałych 6 potomstwach różniły się między sobą. Część z nich miała jasnozielone liście, cieńszą okrywę woskową i lekkie owłosienie, co świadczyło o ich mieszańcowej naturze. Ważną cechą, która ujawniła się wśród roślin 9 potomstw było występowanie wyraźnych międzywęźli, tworzących łodygę nadliścieniową.

Charakterystyka cech morfologicznych roślin mieszańcowych pokolenia F₁ MS-8 *B. napus* × *B. carinata* w fazie kwitnienia

Rośliny mieszańcowe pokolenia F₁ w fazie kwitnienia pod względem morfotypu były bardziej zbliżone do formy matecznej (*B. napus*). Wśród roślin mieszańcowych w tej fazie nieznacznie uwidoczniły się cechy odziedziczone po formie ojcowskiej (barwa blaszki liściowej i obecność włosków na liściach). Stąd też dokładniejsze obserwacje dotyczyły kwiatów.

Wymiary płatków korony i pręcikowia wskazują na to, że kwiaty mieszańców były wyraźnie zredukowane. Płatki korony roślin F₁ były krótsze i węższe, w porównaniu z kwiatami form rodzicielskich (tab. 1). Długość nitki pylnika była

pośrednia pomiędzy MS-8 a *B. carinata*, ale średnia długość pylnika i słupka u mieszańców była taka sama jak u ich formy matecznej (tab. 2). Kolor kwiatów był żółty, wszystkie rośliny były męskosterylne.

Tabela 1

Wymiary płatków korony roślin pokolenia F_1 MS-8 *B. napus* × *B. carinata* nie porażonych fitoplazmami i gatunków rodzicielskich — *Size of corolla petals of F_1 progeny MS-8 *B. napus* × *B. carinata* not infected with phytoplasmas and parental species [mm]*

Obiekt <i>Item</i>	Płatki korony — <i>Corolla petals</i>						Długość × szerokość <i>Length ×</i> <i>width</i>
	długość — <i>length</i>			szerokość — <i>width</i>			
	średnia <i>mean</i>	min	max	średnia <i>mean</i>	min	max	
MS-8	13,9	13,1	14,7	6,7	6,1	7,5	93,1
<i>B. carinata</i>	15,3	14,6	15,8	7,1	6,8	8,3	108,6
<i>B. napus</i> Lisek	15,1	12,9	18,2	8,2	6,7	10,1	123,8
MS-8 × <i>B. carinata</i>	11,8	7,0	17,0	5,4	3,0	7,0	63,7
NIR — <i>LSD</i> _{0,05}	1,6		0,76				15,04

Tabela 2

Wymiary pręcikowia i słupkowie roślin pokolenia F_1 nie porażonych fitoplazmami i gatunków rodzicielskich — *Size of anthers and pistils of F_1 progeny MS-8 *B. napus* × *B. carinata* not infected with phytoplasmas and parental species [mm]*

Obiekt <i>Item</i>	Pręcik — <i>Stamen</i>							Słupek — <i>Pistil</i>			Stosunek pręcik/ słupek <i>Stamen/ pistil ratio</i>
	nitka — <i>filament</i>			pylnik — <i>anther</i>			razem <i>total</i>				
	średnia <i>mean</i>	min	max	średnia <i>mean</i>	min	max		średnia <i>mean</i>	min	max	
MS-8	3,5	3,2	3,8	1,2	1,0	1,6	4,7	9,2	8,8	11,1	0,51
<i>B. carinata</i>	7,2	6,8	7,9	1,6	1,5	1,9	8,8	8,7	8,3	12,5	1,01
<i>B. napus</i> Lisek	8,4	7,6	8,9	1,7	1,4	1,8	10,1	10,2	8,0	13,1	0,99
MS-8 × <i>B. carinata</i>	5,1	3,2	8,1	1,2	0,8	1,5	6,3	9,7	5,0	15,0	0,65
NIR — <i>LSD</i> _{0,05}	2,14			0,25			2,38	0,49			0,24

Obserwacje procesu mejozy u mieszańców pokolenia F_1

W procesach mejotycznych roślin mieszańcowych pokolenia F_1 wystąpiły różnego rodzaju zaburzenia. Powszechnym zjawiskiem był brak synchronizacji podziałów, który zaobserwowano u roślin mieszańcowych. Profaza I mejozy generalnie przebiegała prawidłowo, jedynie widoczne było wciąż dzielące się komórki tapetum. W metafazie I u znacznej części badanych obiektów z kombinacji MS-8

B. napus × *B. carinata* zaobserwowano od 2 do 5 chromosomów, które nie zostały włączone w płytkę metafazalną (fot. 1). W kilku komórkach archesporialnych roślin tej kombinacji zaobserwowano multiwalenty.

W komórkach będących w anafazie I mejozy u połowy przebadanych roślin MS-8 × *B. carinata* występowały mosty anafazalne (od 1 do 2) (fot. 2) oraz opóźnione chromosomy. Tkanka tapetum w tej fazie procesu mejotycznego była dwujądrowa. Telofaza I przebiegała prawidłowo u większości zbadanych roślin i jedynie u 30% analizowanych roślin zauważono w niektórych komórkach od 2 do 6 opóźnionych chromosomów.

Metafaza II i anafaza II nie przebiegała prawidłowo u większości roślin mieszańcowych i można było dostrzec chromosomy poza płytką metafazalną (fot. 3) oraz mosty i opóźnione chromosomy w anafazie (fot. 4). U połowy analizowanych roślin kombinacji MS-8 × *B. carinata* zaobserwowano komórki w telofazie II mejozy, w których od 1 do 4 chromosomów było opóźnionych. Bardzo powszechnym zjawiskiem było występowanie w tetradach od 1 do 3 mikrojąder. Zaobserwowano również pentady, które tworzyły 4 mikrospory normalnej wielkości i 1 mikrojądro lub 3 mikrospory normalnej wielkości i 2 mikrojądra (fot. 5, 6), a także heksady, w skład których wchodziły 2 mikrojądra i 4 mikrospory normalnej wielkości. Po rozpadzie tetrad, pentad oraz heksad widoczne były ziarna pyłku różnej wielkości. W pylnikach z największych pąków kwiatowych widoczne były degenerujące mikrospory (tuż po rozpadzie tetrad) lub ziarna pyłku. W tych pylnikach ilość tkanki tapetum była znikoma, a komórki tapetum były zdeformowane.

Obserwacje procesu mitozy u mieszańców pokolenia F₁

Proces mitozy u roślin mieszańcowych pokolenia F₁ przebiegał w dużym stopniu prawidłowo i jedynie w kilku komórkach obserwowano niewielkie zaburzenia. Podczas analizy procesu mitozy u roślin z kombinacji MS-8 *B. napus* × *B. carinata* zaobserwowano w kilku komórkach dwa chromosomy, które nie zostały włączone w płytkę metafazalną. U analizowanych mieszańców liczba chromosomów mieściła się w zakresie od 35 do 37 chromosomów.

Analiza zmian morfologiczno-rozwojowych kwiatów roślin z kombinacji MS-8 × *B. carinata* zaatakowanych przez fitoplazmy

Zniekształcone przez fitoplazmy kwiaty pojawiły się jedynie na wierzchołkach rozgałęzień wszystkich roślin z kombinacji MS-8 × *B. carinata*, ale tylko w jednej z trzech lokalizacji, tj. na polu doświadczalnym w Poznaniu. W pozostałych dwóch lokalizacjach, tj. w Dłoni i w szklarni żadna z roślin mieszańcowych, jak i kontrolnych nie została porażona przez fitoplazmy. Kwiaty zaatakowanych przez fitoplazmy roślin różniły się morfologicznie od kwiatów roślin zdrowych. Płatki korony miały postać liści, były zielone, skórzaste, pokryte grubym woskowym nalotem i bardzo szczelnie okrywały wnętrze kwiatu (fot. 7).

Słupki zdeformowanych kwiatów były płaskie oraz wyraźnie dłuższe i szersze w odróżnieniu od słupków zdrowych roślin. Długość szyjki słupka była średnio sześć razy mniejsza od długości zalążni. Szyjki tych słupków były krótsze od szyjek słupków roślin kontrolnych *B. napus* i linii MS-8 oraz mieszańców MS-8 × *B. carinata* (wolne od fitoplazmy), w których zalążnia słupka była trzy razy dłuższa od jego szyjki. Znamię słupka kwiatów roślin kontrolnych było całkowite lub lekko podzielone (fot. 8, 9). Kwiaty zaatakowane przez fitoplazmy charakteryzowały się słupkiem o znamieniu głęboko podzielonym, wyglądającym jakby to były dwa oddzielne znamiona (fot. 10). U niektórych obiektów zaobserwowano znamię słupka podzielone w dwóch miejscach, co nie zdarzało się w kwiatach roślin kontrolnych.

Słupki roślin MS-8 × *B. carinata* zaatakowanych przez fitoplazmy były często wygięte w literę „C”, a ich wnętrze było zdeformowane, co uniemożliwiało określenie liczby zalążków. Bardzo powszechnym zjawiskiem było występowanie w pąkach tych roślin dwóch lub trzech słupków. Jeden z nich miał prawidłowo rozwiniętą zalążnię z zalążkami, a pozostałe najprawdopodobniej wykształciły się z pręcików, w których na nitkach pylnikowych, zamiast pylników, powstały znamiona. Zaobserwowano w kilku obiektach dodatkowe słupki tworzące własne

Fot. 1–13. Podział mejotyczny oraz deformacje kwiatów u międzygatunkowych mieszańców F₁ MS-8 *B. napus* × *B. carinata* — *Meiotic divisions and flower deformations in F₁ interspecific hybrids MS-8 B. napus × B. carinata*

- Fot. 1. Metafaza I – 5 chromosomów poza płytką metafazalną — *Metaphase I – 5 chromosomes away from the metaphasal plate*
- Fot. 2. Anafaza I – mosty chromosomowe i opóźnione chromosomy — *Anaphase I – chromosome bridge and lagging chromosomes*
- Fot. 3. Metafaza II – 7 chromosomów poza płytką metafazalną — *Metaphase II – 7 chromosomes away from the metaphasal plates*
- Fot. 4. Późna anafaza II – opóźnione chromosomy — *Late anaphase II – lagging chromosomes*
- Fot. 5. Mikrojądro w stadium tetrady — *Micronucleus in tetrad stage*
- Fot. 6. Dwa mikrojądra w stadium tetrady — *Two micronuclei in tetrad stage*
- Fot. 7. Zdeformowane przez fitoplazmy kwiaty roślin mieszańcowych MS-8 *B. napus* × *B. carinata* — *Flowers of MS-8 B. napus × B. carinata hybrid plants deformed by phytoplasmas*
- Fot. 8. Przekrój przez pąk kwiatowy *B. napus*, roślina kontrolna — *Section of B. napus flower bud, control plant*
- Fot. 9. Znamię słupka u rośliny kontrolnej *B. napus* — *Pistil stigma of B. napus in control plant*
- Fot. 10. Podzielone znamię słupka u rośliny mieszańcowej MS-8 *B. napus* × *B. carinata* porażonej przez fitoplazmy — *Divided stigma in MS-8 B. napus × B. carinata hybrid plant infected with phytoplasmas*
- Fot. 11. Trzy słupki w jednym pąku kwiatowym, na jednym ze słupków 2 znamiona, roślina mieszańcowa MS-8 *B. napus* × *B. carinata* zainfekowana fitoplazmami — *Three pistils in one flower bud, one pistil with two stigmas, MS-8 B. napus × B. carinata hybrid plant infected with phytoplasmas*
- Fot. 12. Tkanka archesporialna w fazie mejozy i tapetum u *B. napus*, roślina kontrolna — *Archespor tissue in meiosis and tapetum of B. napus, control plant*
- Fot. 13. Komórki archesporialne w różnych fazach podziału mejotycznego, widoczne słabo wykształcone tapetum u mieszańca MS-8 *B. napus* × *B. carinata* — *Archespor cells in different meiotic stages, visible weakly developed tapetum in MS-8 B. napus × B. carinata hybrid plant*

plansa 1

załążki (do 4 załączków). Inną deformacją było powstanie na jednym słupku dwóch odrębnych znamion, z których jedno położone było prawidłowo, a drugie umieszczone było w połowie długości słupka (fot. 11). W załączni roślin kombinacji MS *B. napus* × *B. carinata* porażonych przez fitoplazmy było średnio 19 załączków, czym nie różniły się od roślin zdrowych tej samej kombinacji. U kontrolnych roślin *B. napus* znajdowały się średnio 22 załączki w załączni.

W pylnikach kontrolnych roślin *B. napus* tkanka tapetalna była dwujądrowa, dobrze wykształcona i równomiernie otaczała całe wnętrze pylnika. Po prawidłowym podziale mejotycznym komórek archesporialnych tworzyły się mikrospory, które dojrzewały w ziarna pyłku (fot. 12). U roślin z kombinacji MS-8 × *B. carinata*, bez względu na to, czy były porażone przez fitoplazmy czy nie, wyraźne i prawidłowo wykształcone tapetum występowało jedynie w najmniejszych pąkach kwiatowych. Im starsze pąki, tym mniej było tkanki tapetum w pylnikach, stawała się ona coraz mniej wyraźna i przezroczysta (fot. 13). W pylnikach największych pąków obserwowano całkowity brak tkanki tapetum i jednocześnie degenerujące ziarna pyłku. W pylnikach roślin MS-8 × *B. carinata* zaatakowanych przez fitoplazmy komórki archesporialne później wchodziły w fazę podziałów mejotycznych, w porównaniu z pylnikami roślin niezainfekowanych. U roślin zdrowych podziały redukcyjne tkanki archesporialnej miały miejsce już w najmniejszych pąkach (2 mm długości), podczas gdy u porażonych roślin miało to miejsce dopiero w pąkach długości 3 mm.

W czasie, gdy w pylnikach kontrolnych roślin *B. napus* obserwowano niedojrzałe mikrospory (tuż po rozpadzie tetrad), spośród komórek ośrodka w załączkach wyodrębniła się jedna komórka archesporialna (fot. 14). Komórka ta zaczynała się dzielić w momencie, gdy ziarna pyłku w pylnikach uzyskały już dojrzałość (fot. 15). Z kolei przy tej samej wielkości pąków z roślin mieszańcowych MS-8 × *B. carinata* nie porażonych przez fitoplazmy w komorach pylnikowych obserwowano już degenerujące ziarna pyłku, a w załączkach wyodrębniła się komórka archesporialna. Podział tej komórki przebiegał prawidłowo, jednak czasem odbiegał od normalnego procesu. Komórka archesporialna najpierw dzieliła się mitotycznie tworząc dwie komórki: wewnętrzną i przykrywkową, otoczone warstwą komórek epidermalnych (fot. 16). Następnie komórka wewnętrzna prawdopodobnie dzieliła się mejotycznie, aby w końcowym etapie uformować tetradę (fot. 17) i po jej rozpadzie z jednej z mikrospor wytworzyć woreczek załączkowy (fot. 18). Tego typu rozwoju makrospory nie zaobserwowano u mieszańcowych roślin porażonych przez fitoplazmy. U tych roślin stosunkowo rzadko powstawały komórki archesporialne w załączkach i bardzo często komórki ośrodka pozostawały niezróżnicowane. W czasie, gdy wyodrębniały się komórki archesporialne w załączkach, mikrospory degenerowały będąc jeszcze w tetradach.

- Fot. 14–18. Makrosporogeneza u roślin kontrolnych *B. napus* i mieszańców MS-8 *B. napus* × *B. carinata* nie porażonych przez fitoplazmy i porażonych fitoplazmami — *Macrosporogenesis in B. napus control plants and in MS-8 B. napus* × *B. carinata* hybrid plants free and infected with phytoplasmas
- Fot. 14. Komórka archesporialna w zalążku u *B. napus* — *Archepor cell in the ovule of B. napus*
- Fot. 15. Tetrada w zalążku u *B. napus* — *Tetrad in B. napus ovule*
- Fot. 16. Komórka wewnętrzna i komórka przykrywkowa w zalążku mieszańców MS-8 *B. napus* × *B. carinata* — *Inner and parental cell in the ovule of MS-8 B. napus* × *B. carinata*
- Fot. 17. Tetrada w zalążku mieszańca MS *B. napus* × *B. carinata* wolnego od fitoplazm — *Tetrad in the ovule of MS-8 B. napus* × *B. carinata* hybrid plant not infected with phytoplasmas
- Fot. 18. Jednojądrowy woreczek zalążkowy w zalążku mieszańców MS-8 *B. napus* × *B. carinata* wolnych od fitoplazm — *One nuclear embryo sack in the ovule of MS-8 B. napus* × *B. carinata* hybrid plant not infected with phytoplasmas

Dyskusja

Wszystkie rośliny mieszańcowe analizowanych potomstw wykazywały męską sterylność. Płatki kwiatów tych roślin były węższe i krótsze w porównaniu z męskopłodnymi roślinami ojcowskimi. Słupki sterylnych kwiatów były tej samej wielkości, co w kwiatkach płodnych gatunków użytych do krzyżowania, natomiast pręcikowie były silnie zredukowane. Zredukowane pręciki miały krótką nitkę pręcikową i osiągały zaledwie połowę długości słupka. Porównywalny stosunek długości pręcikowia do długości słupkowiec zaobserwowała Bartkowiak-Broda (1991) w bada-

niach nad męską niepłodnością u rzepaku. Pylniki sterylnych roślin były słabo wykształcone, stożkowate i u wszystkich analizowanych roślin nie wytwarzały pyłku. W literaturze dostępnej na ten temat przeważają doniesienia, w których autorzy opisują powszechnie występujące u roślin męskosterylnych węższe płatki korony i zredukowane pręcikowie w porównaniu z normalnymi (Ogura 1968, Shiga 1976, Mackiewicz i in. 1978, Wojciechowski 1993).

Obserwacje cytologiczne pylników różnych roślin MS wskazują, że zaburzenia ujawniają się przede wszystkim w tapetum. Symptomami nienormalnego rozwoju tapetum są zaburzenia czasu naturalnej degeneracji polegające bądź to na opóźnionym, bądź też na przedwczesnym jego obumieraniu (Laser i Lersten 1972, Bartkowiak-Broda 1991). Obserwacje procesu mikrosporogenezy u roślin mieszańcowych wskazują na to, że jedną z przyczyn ich męskiej niepłodności była degeneracja tapetum przed dojrzewaniem mikrospor. W pylnikach najmniejszych pąków kwiatowych widoczne były wyraźnie wykształcone dwujądrowe komórki tapetum. W pylnikach izolowanych z największych pąków komórki tkanki odżywczej mikrospor występowały tylko sporadycznie i wykazywały różny stopień degeneracji, podobnie jak występujące tam mikrospory. Te obserwacje znalazły swoje odbicie także w analizowanych preparatach trwałych. Na przekrojach przez pąki kwiatowe obserwowano postępującą redukcję warstwy tapetum, która rozpoczęła się od momentu wytworzenia tetrad. Według Bartkowiak-Broda (1991) męska niepłodność typu CMS *ogura* jest wynikiem degeneracji tapetum i mikrospor. Degeneracja ta zachodzi po stadium tetrad niezależnie od warunków środowiskowych, w których rozwijają się rośliny męskoniopodne.

W prezentowanej pracy u mieszańców zaobserwowano nieprawidłowości w przebiegu mejozy, począwszy od metafazy I aż do wytworzenia się spor. Często występującym zaburzeniem, które potwierdzało mieszańcowy charakter roślin wszystkich kombinacji krzyżowania był brak synchronizacji faz podziałowych. Podobne nieprawidłowości zauważył Springer (2004) w badaniach nad mieszańcami z rodzaju *Brassica*. W jednym pylniku można było dostrzec komórki będące w początkowym etapie mejozy oraz takie, w których podziały redukcyjne dobiegały końca. Należy zauważyć, że w komórkach analizowanych roślin mieszańcowych oprócz genomów A i C występuje także genom B z *B. carinata*. To może tłumaczyć większe nasilenie anomalii w rozdziale chromosomów tych roślin w odróżnieniu od roślin mieszańcowych otrzymanych uprzednio z dwóch innych kombinacji krzyżowania (Wojciechowski, Lewandowska 2006), które posiadają tylko genomy A i C. Choudhary i Joshi (1999) zauważyli podobne nasilenie anormalnych podziałów mejotycznych u mieszańców, które oprócz genomów A i C posiadały także genom B. Według wyżej wymienionych autorów i Olsson'a (1960) takie nieprawidłowości u mieszańców ABC wskazują na większe pokrewieństwo genomu A do C niż do B.

Zaburzeniem najczęściej pojawiającym się w trakcie mejozy u analizowanych mieszańców były opóźnione chromosomy w metafazie I i II, anafazie I i II oraz telofazie I i II. Według Nwankiti (1970) opóźnione chromosomy mogą tworzyć mikrojądra lub aktywne bieguny. Prowadzi to do powstania komórek macierzystych pyłku z różną liczbą spor. W prezentowanej pracy komórki macierzyste pyłku przybierały formę tetrad, pentad, a nawet heksad. W takich układach mikrospor znajdowało się od 1 do 3 mikrojąder.

W metafazie I mejozy u roślin mieszańcowych zaobserwowano zjawisko łączenia się różnej liczby chromosomów w jeden multiwalent. Jednak ze względu na niską jakość obrazu mikroskopowego trudno było jednoznacznie określić ile chromosomów wchodziło w skład danego multiwalentu. Nwankiti (1970) sądzi, że poliwalentne układy chromosomów są najbardziej odpowiedzialne za trudności w rozchodzeniu się chromosomów w anafazie I i II, w wyniku czego mogą powstać aneuploidalne gamety. Według Choudhary i Joshi (1999) pojawienie się multiwalentów jest atrybutem koniugacji chromosomów z genomów A, B i C rodzaju *Brassica* i świadczy o częściowej homologii pomiędzy tymi genomami. Podobne układy chromosomów w badaniach nad mieszańcami oddalonymi w obrębie rodzaju *Brassica* obserwowali także Wojciechowski (1985), Kirti i in. (1995) oraz Springer (2004).

Na wierzchołkach rozgałęzień części roślin mieszańcowych F₁ pojawiły się zdeformowane kwiaty. Według danych literaturowych owe zniekształcenia są wynikiem bytujących we floemie mikroorganizmów zwanych fitoplazmami (Kamińska 2004, Bertacini i in. 1998, Starzycki i Starzycka 2000). Fitoplazmy są przyczyną bardzo destrukcyjnych chorób u ponad 600 gatunków roślin (Kamińska 2004). U rzepaku ozimego porażenie przez fitoplazmy objawia się karłowatością i miotlastym pokrojem roślin, poczerwienieniem, żółknięciem lub chlorozą liści, zielonymi płatkami korony oraz rozległymi zniekształceniami słupków roślin (Bertacini i in. 1998). U roślin mieszańcowych w analizowanym doświadczeniu zmiany morfologiczne obejmowały tylko kwiaty. Płatki korony były zielone, skórzaste, podobne do liści, bardzo szczelnie obejmowały cały kwiat. Lehmann i Skadow (1971) określili zielone płatki pojawiające się u rzepaku jako ewolucyjną regresję części kwiatowych do liści. Zdeformowane słupki były płaskie, wyraźnie dłuższe i szersze w odróżnieniu od słupków zdrowych roślin i przyjmowały różne kształty. Zdeformowane kwiaty nie wiązały łuszczyn. W zalążkach z tych kwiatów spośród komórek ośrodka wyodrębniła się komórka macierzysta makrospory, która nie wchodziła w dalsze podziały. Jest to dość osobliwy przypadek, który dotychczas nie został w literaturze opisany. Zdeformowane kwiaty wykazywały męską sterylność, podobnie jak u wszystkich badanych roślin mieszańcowych. Jediną różnicą był fakt, że komórki archesporialne mikrospor później wchodziły w podziały mejotyczne niż miało to miejsce u mieszańców nie porażonych przez fitoplazmy.

Wydaje się, że najbardziej istotny jest fakt, iż rośliny zainfekowane pojawiły się w obrębie tylko jednej kombinacji krzyżowania MS-8 *B. napus* × *B. carinata*. Sugeruje to genetyczne predyspozycje tej grupy roślin do porażenia przez fitoplazmy, jednak ten pogląd nie ma potwierdzenia w literaturze. Sposób zainfekowania roślin kombinacji MS-8 *B. napus* × *B. carinata* przez wyżej wymienione mikroorganizmy nie jest znany. W swych badaniach Starzycki i Starzycka (2000) wykazali, że fitoplazmy mogą przenosić się wraz z materiałem siewnym. Nie znajduje to jednak potwierdzenia w prezentowanej pracy. Nasiona mieszańców MS-8 *B. napus* × *B. carinata* zostały wysiane w trzech miejscach: na poletku doświadczalnym AR w Poznaniu, na polu stacji doświadczalnej AR w Dłoni oraz w szklarni AR w Poznaniu. Tylko rośliny rosnące na poletku doświadczalnym AR w Poznaniu uległy porażeniu przez fitoplazmy. Może to oznaczać, że właśnie w tym miejscu były najmniej dogodne warunki dla rozwoju roślin tej kombinacji krzyżowania. Stres wodny i temperaturowy oraz żerowanie mszyc spowodowały ujawnienie się defektów wywołanych fitoplazmami tylko u mieszańców mających genetycznie uwarunkowaną niską odporność na stropy biotyczne. W tym przypadku były to rośliny mieszańcowe MS-8 *B. napus* × *B. carinata*, które w środowisku, w którym brak było stresów biotycznych i abiotycznych (szok termiczny, brak wody, mszyce) nie wykazywały objawów porażenia przez fitoplazmy.

Podsumowanie

1. Mieszańcowy charakter roślin pokolenia F₁ ujawnił się w stadium rozety. Wśród badanych mieszańców MS-8 *B. napus* × *B. carinata* wystąpiły rośliny wyglądem zbliżone do formy matecznej lub do formy ojcowskiej, a częściowo pośrednie pomiędzy gatunkami rodzicielskimi. Kwiaty wszystkich roślin pokolenia F₁ były męskosterylne i charakteryzowały się silną redukcją płatków korony oraz pręcikowia. Zdegenerowane pylniki nie wytwarzały ziaren pyłku.
2. Zaburzenia w procesie mejozy oraz w funkcjonowaniu tapetum były główną przyczyną degeneracji mikrospor i powstawania martwych ziaren pyłku.
3. Zainfekowane przez fitoplazmy rośliny pojawiły się tylko w obrębie kombinacji MS-8 *B. napus* × *B. carinata*, co świadczy o występujących różnicach genotypowych odnośnie wrażliwości na porażenie przez fitoplazmy w określonych warunkach środowiskowych.

Literatura

- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej niepłodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. *oleifera*. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 35 (3-4): 3-60.
- Bertacini A., Vovackova Z., Vibio M., Franova J., Novvatil M., Spak J., Nelesavova J. 1998. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian *Brassica* phytoplasmas and their relationships to the aster yellow group. Plant Pathology, 47: 317-324.
- 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.
- Choudhary B.R., Joshi P. 1999. Interspecific Hybridization in Brassica. www.regional.org.au: 516.
- Filutowicz A., Kuźdowicz A. 1951. Mikrotechnika roślinna. PWRiL, Warszawa.
- Kamińska M. 2004. Wiadomości ogólne. Choroby roślin ogrodniczych powodowane przez fitoplazmy. Hortpress, Warszawa: 8-28.
- Kirti P.B., Banga S.S., Prakash S., Chopra V.L. 1995. Transfer of *Ogu* cytoplasmic male sterility to *Brassica juncea* and improvement of the male sterile line through somatic cell fusion. Theor. Appl. Genet., 91: 517-521.
- Laser K.D., Lersten N.R. 1972. Anatomy and cytology of mikrosporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev., 3: 425-454.
- Lehmann W., Skadow K. 1971. Untersuchungen zur Verbreitung, Atiologie und Vektorübertragbarkeit der Blütenvergrünung des Rapes. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz., 7: 323-336 – cytat za Bertacini i in. (1998).
- Mackiewicz T., Wojciechowski A., Krzymański J. 1978. Ustalenie charakteru męskiej sterylności u szeregu rodów rzepaku ozimego. Zeszyty Problemowe IHAR, Wyniki Badań nad Rzepakiem Ozimym lata 1977-1978: 97-103.
- Nwankiti O. 1970. Cytogenetics and breeding studies with *Brassica*. I. Cytogenetics experiments with *Brassica napocampestris*. Hereditas., 66: 109-126.
- 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.
- Ogura H. 1968. Studies on the new male sterility in Japanese radish with special references to the utilization of this sterility towards the practical rising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Ragostrima Univ., 62: 39-78.
- Olsson G. 1960. Species crosses within the genus *Brassica*. II. Artificial *Brassica napus* L. Hereditas, 46: 351-386.
- Rahman M.H., Joersbo M., Poulsen M.H. 2001. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality. Plant Breeding, 120 (6): 473-478.
- Shiga T. 1976. Cytoplasmic Male Sterility and its Utilization for Heterosis Breeding in Rapeseed, *Brassica napus* L. JARQ 10 (4): 178-182.
- Springer B. 2004. Bariery krzyżowalności w rodzaju *Brassica*. Praca doktorska, AR Poznań.
- Starzycki M., Starzycka E. 2000. Deformacje rodziców i potomstwa roślin rzepaku (*B. napus*) zakażonych przez *Phytoplasma* sp. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXI (2): 399-408.

- Wojciechowski A. 1985. Interspecific hybrids between *Brassica campestris* and *B. oleracea*. II. Morphological traits. Somatic chromosome number. Meiotic division and microsporogenesis. *Genetica Polonica*, 26 (4): 437-446.
- Wojciechowski A. 1993. Some morfological and phenological traits and fertility of lines of artificial winter oilseed rape originated from male-sterile plants (*Brassica napus* var. *oleifera* L.). *Genetica Polonica*, 34 (4): 317-325.
- 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 (1): 17-30.