

Dagmar Tomášková, Miroslav Bechyně*, Miroslava Vyvadilová, Vratislav Kučera
Research Institute of Crop Production, * Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic

Kariologiczna ocena mieszańców *Brassica napus* L. x *Brassica rapa* L. pod względem stabilizacji cechy żółtego zabarwienia nasion rzepaku

Karyological evaluation of *Brassica napus* L. x *Brassica rapa* L. hybrids for stabilization of yellowseed trait in rapeseed

Celem analiz liczby chromosomów u mieszańców międzygatunkowych resyntetyzowanego *Brassica napus* x *B. rapa* była selekcja roślin dawców ($2n = 38$), odpowiednich do produkcji diploidalnych linii rzepaku o żółtych nasionach. Stwierdzono duże różnice w somatycznej liczbie chromosomów w obrębie danej rośliny (miksploidalność) i pomiędzy różnymi roślinami. Stopień ploidności w wierzchołkach korzeniowych poszczególnych żółtych nasion wahał się od 20 do 40 chromosomów. Dlatego trudno było o określenie dokładnej liczby chromosomów. Rośliny, które mogły zostać dawcami stanowiły 3%. Podobne wyniki badań kariologicznych uzyskano w przypadku regenerantów, uzyskanych z kultur mikrosporowych. Pomędzy 51 spontanicznymi dihaploidami tylko jedna roślina miała liczbę chromosomów równą 38. Morfologia regenerantów porównywana była z analizami cytologicznymi w celu odróżnienia *Brassica napus* od *Brassica rapa*.

The aim of chromosome number analysis in resynthesized *B. napus* x *B. rapa* hybrids was the selection of donor plants ($2n = 38$) suitable for the production of double—haploid lines of yellow—seeded rapeseed. Many differences in somatic chromosome number within one plant (mixoploidy) and among different plants were found. The ploidy level in root tips of individual selected yellow seeds varied approximately in the range from 20 to 40 chromosomes. Therefore, it was rather difficult to establish the chromosome number exactly. The amount of appropriate donor plants was only 3%. Similar results of karyological analysis were obtained in regenerated plants derived from microspore cultures. Within 51 spontaneous dihaploids only one plant possessed diploid chromosome number 38. The morphology of regenerants was compared with cytological evaluation in order to distinguish *B. napus* and their hybrids with *B. rapa*.

Wstęp

Niezbędną czynnością w dążeniu do uzyskiwania linii o dihaploidalnej liczbie chromosomów u rzepaku i innych gatunków z rodziny *Brassicaceae* jest cytologiczna kontrola liczby chromosomów, ponieważ metoda ta jest niezawodnym kryterium przy wstępnej ocenie uzyskanych regenerantów już we wczesnych

stadiach ich rozwoju (Vyvadilová i in. 1992). Ważne są również analizy kariologiczne mieszańców rzepaku i rzepiku wytworzonych w celu uzyskania rzepaku żółtonasiennego (Bechyně 1995), ponieważ przy krzyżowaniu gatunków oddalonych dochodzi do zakłóceń w przebiegu mejozy, a potomstwo nie jest cytologicznie ustabilizowane. Oprócz tych zmian mogą występować nieregularności w mitozie, będące przyczyną tzw. aneusomaty czności przejawiającej się znacznym zróżnicowaniem w liczbie chromosomów.

Celem niniejszej pracy było dokonanie analizy kariologicznej mieszańców międzygatunkowych rzepaku i rzepiku oraz dobór dawców do pobrania mikrospor przeznaczonych do uzyskiwania podwojonych haploidów o ustalonej żółtonasienności.

Material i metody

Analizy kariologiczne wykonano u mieszańców żółtonasiennego rzepiku jarego — *Brassica rapa* var. Yellow Sarson ($2n = 20$, AA) z kapustą pastewną — *Brassica oleracea*, cv. Furchenkohl ($2n = 18$, CC) z ciemnożółtymi nasionami, krzyżowanych wstecznie z pierwszą formą rodzicielską *Brassica rapa* var. Yellow Sarson.

Liczbę chromosomów somatycznych określano w merystemach korzeni, pobierając je ze skielkowanych żółtych nasion. Do dalszej hodowli przeznaczono jedynie rośliny posiadające odpowiednią liczbę chromosomów, świadczącą o ich mieszańcowości, tj. 29 chromosomach. Następnej oceny dokonywano na młodych liściach dojrzałych roślin. Preparaty tkanki merystematycznej sporządzano metodą rozmazową. Po przygotowaniu i utrwaleniu stożków wzrostu korzeni chromosomy barwiono przy pomocy reakcji Feulgena, natomiast dla liści stosowano acetoorceinę.

Wyniki

Analizy kariologiczne przeprowadzono najpierw dla 104 korzeni pojawiających się przy wschodach. Następnej oceny dokonywano na młodych liściach roślin w pełni rozwoju wegetatywnego, ponieważ zaobserwowano, iż liczba chromosomów w tkance liściowej nie zawsze jest jednakowa z liczbą chromosomów występujących w tkance korzeniowej. Ponadto w większości przypadków stwierdzono miksploidalność w obrębie samej tkanki (korzeń albo liść), co utrudniało dokładne określenie liczby chromosomów w danej roślinie. W związku z tym, iż właściwa liczba chromosomów $2n = 38$ — charakterystyczna dla rzepaku, stwierdzana była w wyjątkowych przypadkach, do dalszej uprawy wybierano

rośliny posiadające liczbę chromosomów od 30 do 32. Z ogólnej liczby 13 uprawianych roślin 3 zostały wybrane do pobrania mikrospor i tak dla formy: w wariacie 1/11 ($2n = 30, 34$) uzyskano 26 regenerantów o liczbie chromosomów od 10 do 36, formę 2/6 ($2n = 36, 38$) reprezentowało 76 wyprodukowanych roślin, u których liczba chromosomów wynosiła od 9 do 38, z formy 7/6 ($2n = 30, 34, 38$) uzyskano 49 regenerantów (liczba chromosomów od 10 do 40). W przypadku roślin regenerowanych, oprócz analiz kariologicznych, oceny płodności i sterylności dokonywano obserwacji morfologicznych, aby było możliwe odróżnienie rzepaku od rzepiku oraz ew. form przejściowych pomiędzy nimi (tab. 1). Aspekty te brano pod uwagę przy dalszym doborze roślin przeznaczonych do kolchicynowania w celu uzyskania roślin dihaploidalnych.

Tabela 1

Ocena cytologiczna i morfologiczna zmienności regenerantów kultur mikrosporowych mieszańców *B. napus* x *B. rapa* — *Evaluation of cytological and morphological variability in regenerants derived from microspore culture of B. napus x B. rapa hybrids*

Forma	Liczba regenerantów	Liczba chromosomów	Liczba roślin		Liczba regenerantów	
			<i>B. napus</i>	<i>B. rapa</i>	haploidalnych	dihaploidalnych
1/11	26	10–36	–	12	11	4
2/6	76	9–38	23	10	40	28
7/6	49	10–40	10	16	27	19

Kolejna grupa wybranych roślin ze zdolnymi do zapłodnienia kwiatami i liczbą chromosomów przekraczającą 30, uważana była za spontaniczne dihaploidy. Tylko w jednym przypadku stwierdzono liczbę chromosomów wynoszącą 38 i jednocześnie płodne kwiaty. U potomstwa wybranych roślin w dalszym ciągu będą przeprowadzane obserwacje występowania żółtych nasion. Wykonane zostaną także obserwacje kariologiczne i morfologiczne występowania chimer, ponieważ jak to wynika z ujawnionej miksoploidalności w przypadku jednej tkanki mogą wystąpić różnice w liczbie chromosomów korzeni i liści.

Dyskusja

Wyniki badań kariologicznych mieszańców rzepaku i rzepiku ujawniły dużą zmienność, którą można zaliczyć do tzw. aneusomatyczności. Zjawiskiem tym zajmował się szczegółowo D'Amato (1995). Aneusomatyczność jest uwarunkowana genetycznie. Może ona występować u gatunków i odmian roślin, a dotyczy chromosomów organów generatywnych oraz chromosomów somatycznych, jak również

roślin regenerowanych *in vitro*. Zmiany liczby chromosomów u form aneusomatycznych są wynikiem następujących zakłóceń podziału mitotycznego:

1. Chromosomy nie ustawiają się w płaszczyźnie (równikowej).
2. Chromosomy opóźniają się podczas anafazy.
3. Brak dysjunkcji chromatydowej.
4. Następuje podział wrzeciona kariokinetycznego.

Wymienione powyżej zakłócenia mogą występować jednocześnie w jednym osobniku aneusomatycznym. U mieszańców generatywnych i somatycznych aneusomatyczność wynika z eliminacji niektórych lub prawie wszystkich chromosomów jednego z rodziców. Okoliczności te stanowią najbardziej sprzyjające warunki do występowania aneusomatyczności w organizmach roślinnych.

Przyczyną wystąpienia aneusomatyczności może być także udział wielu komórek przy wytwarzaniu pąków z heterogenicznej populacji komórkowej kalusa i zawiesiny komórkowej.

Okres wystąpienia aneusomatyczności może być zróżnicowany. W przypadku mieszańców generatywnych i somatycznych eliminacja chromosomów zaczyna się w początkowym stadium rozwoju po zapłodnieniu i przebiega dalej z odchyleniami w tkance wegetatywnej. Oprócz takich przypadków, mechanizm odpowiedzialny za powstanie aneusomatyczności pojawia się dopiero podczas dalszego rozwoju rośliny w następstwie mitozy, poprzedzającej rozwój tkanki sporofitycznej.

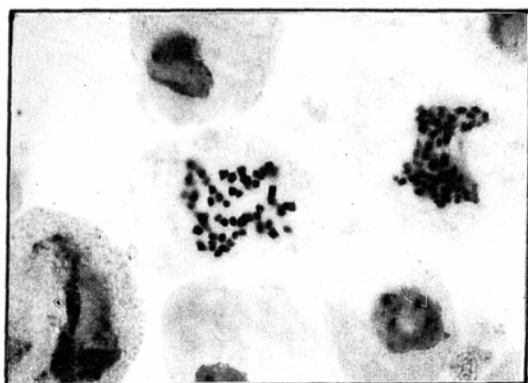
Przebieg i powstanie aneusomatyczności zależy w dużym stopniu od konstytucji genetycznej. U roślin diploidalnych, u których liczba haploidalna równa jest liczbie podstawowej ($n = x$), komórki diploidalne przerosną aneuploidalne i nastąpi selekcja diploidów, powodując iż tkanki sporofityczne będą złożone wyłącznie z komórek diploidalnych, a potomstwo będzie tylko diploidalne. W przypadku poliploidów, selekcja diploidów nie występuje a tkankę sporofityczną tworzą komórki o różnej liczbie chromosomów, przy czym potomstwem są rośliny euploidalne i aneuploidalne. Ponieważ genom *B. napus* nie jest ewolucyjnie diploidalny (Prakash i Chopra 1991), można oczekiwać, że selekcja diploidów nie zajdzie, a potomstwo mieszańców będzie cytologicznie nieustabilizowane. Przy kariologicznej ocenie mieszańców rzepaku i rzepiku, oprócz wymienionej liczby chromosomów somatycznych w obrębie jednej rośliny i jednej tkanki, stwierdzono występowanie komórek o dwóch i trzech jądrach, co potwierdza przypuszczenie, że większość zmian w liczbie chromosomów wynika z aberacji mitotycznych. Stwierdzono występowanie mostków chromosomowych. Zjawisko to może być przyczyną zmian w liczbie chromosomów i powstawania mikrojąder, które pojawiały się w niedzielających się komórkach. Należy również pamiętać, że przy krzyżowaniu oddalonym powstają zakłócenia w mejozie, prowadzące do niestabilności cytologicznej. Wszystkie przedstawione tutaj zjawiska świadczą o tym, że problematyka hodowli rzepaku żółtonasiennego przy pomocy krzyżowania oddalonego jest złożona, a ustalenie cechy żółtonasienności będzie trudne.



Rys. 1. Regenerant typu *Brassica rapa* L.



Rys. 2. Regenerant typu *Brassica napus* L.



Rys. 3. Metafaza w mitozie mieszańca *Brassica napus* L. x *Brassica campestris* L.

Literatura

- D'Amato F. 1995. Aneusomaty in vivo and in vitro in higher plants. *Caryologia* 48: 85-103.
- Bechyně M. 1995. Development of four valved yellow seeded rapeseed. Proceedings of the Ninth International Rapeseed Congress Rapeseed Today and Tomorrow, 4 to 7 July, 1147-1149, Cambridge, UK.
- Prakash S., Chopra V. L. 1991. Cytogenetics of Crop Brassicas and Their Allies. Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B, Ed. by T. Tsuchiya, P. K. Gupta, 161-180.
- Vyvadilová M., Zelenková S. 1992: Responsiveness in microspore cultures of some cultivars and Czech breeding materials of rapeseed (*Brassica napus* L.) *Genet a Šlecht.*, 28(4): 243-252.
- Vyvadilová M., Zelenková S., Tomášková D., Košner J. 1993. Diplodizace a cytologická kontrola haploidů *Brassica napus* L. *Rostlinná výroba* 39 (2): 129-137.