

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: **51.**

Tytuł zadania: **Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju *Brassica* do bazy genowej rzepaku ozimego.**

Kierownik zadania: **prof. dr hab. T. Cegielska-Taras**

Cel zadania na 2014 rok:

A/ Uzyskanie roślin z rodzaju *Brassica rapa* i *Brassica oleracea* z pędami generatywnymi odpowiednimi do krzyżowań międzygatunkowych.

B/ Uzyskanie roślin mieszańcowych, poprzez krzyżowanie międzygatunkowe, z diploidalnych gatunków podstawowych: *B. rapa* i *B. oleracea*.

Material

Materiałem do badań w obu tematach były różne podgatunki *B. rapa*: dwie odmiany rzepiku jarego, pięć odmian rzepiku ozimego i kapusta pekińska oraz *B. oleracea*: trzy odmiany jarmużu i jedna odmiana kapusty brukselskiej. Nasiona odmian rzepiku jarego i ozimego pochodzą z kolekcji roślin oleistych w Borowie oraz z Banku Genów w Radzikowie. Nasiona odmian jarmużu, kapusty brukselskiej i kapusty pekińskiej – komercyjne – dostępne w sprzedaży.

Ad. A. Badania nad wymaganiami jarowizacyjnymi *B. rapa* i *B. oleracea*

Metody

Rośliny *B. rapa* jaryzowano, standardowo w fazie 4-5 właściwych liści w komorach chłodniczych przez 8 tygodni w temperaturze +4°C przy ośmiogodzinnym oświetleniu. Natomiast rośliny kapusty pekińskiej do jaryzacji przenoszono w stadium dobrze wykształconej rozety liści. Po czasie jaryzacji rośliny przesadzano do większych pojemników z glebą i dalsza ich wegetacja przebiegała w fitotronie w warunkach 13°C dzień/10°C noc przy 16-godzinnym fotoperiodzie. Wegetacja wszystkich roślin obu badanych gatunków po okresie jaryzacji przebiegała w tych samych warunkach światła i temperatury w fitotronie.

Wyniki

Brassica rapa. Po ośmioletniej jaryzacji badane formy jare i ozime *B. rapa*, oprócz dwóch odmian rzepiku ozimego, wytwarzały pędy generatywne w ciągu dwu miesięcy. Dlatego okres jaryzacji dla roślin tych dwu odmian rzepiku ozimego przedłużono do dziesięciu tygodni. Po tym czasie uzyskano prawidłowo wykształcone pędy generatywne. Wszystkie badane odmiany jare, po okresie jaryzacji, rozwijały się szybciej oraz wytwarzały bujniejsze pędy kwiatowe.

Brassica oleracea. Rośliny jednej odmiany jarmużu, po okresie standardowej jaryzacji (8 tygodni w temp. +4°C w warunkach krótkiego dnia) w okresie sześciu tygodni zaczęły rozwijać pędy generatywne. Natomiast roślinom pozostałych dwu odmian jarmużu okres jaryzacji w fazie 5 liści przez 8 tygodni był niewystarczający do wytworzenia pędów kwiatowych. Dla tych odmian przedłużano jaryzację do 12 lub nawet do 16 tygodni. Rośliny brukselki jaryzowane w warunkach komory jarowizacyjnej w stadium 5 liści, po 12 i 16 tygodniach jaryzacji w ogóle nie wytwarzały pędów. W kolejnym eksperymencie do jaryzacji kierowano rośliny brukselki w stadium 10-16 prawidłowo wykształconych liści. Po 16 tygodniach jaryzacji w komorach chłodniczych rośliny te przeniesiono do fitotronu. W przeciągu kolejnych dwu miesięcy zaobserwowano powolne tworzenie pędów generatywnych.

Dyskusja

Na zakwitanie roślin ozimych i dwuletnich wpływają procesy biochemiczne indukowane wpływem niskich temperatur. Rośliny te bez okresu chłodu rozwijają się tylko wegetatywnie, nie tworząc pędów kwiatowych (Kopcewicz 2002). W literaturze nie spotyka się prac dotyczących warunków sztucznej wernalizacji roślin ozimych z rodzaju *Brassica*, oprócz rzepaku, ani roślin dwuletnich. W przeprowadzonych badaniach rośliny większości odmian rzepiku ozimego w stadium czterech-pięciu liści przechodziły wernalizację w ciągu ośmiu tygodni, taką - jaką opisano dla rzepaku (Cegielska-Taras 2002) i po tym czasie wchodziły w fazę generatywną. Jedynie tradycyjna odmiana rzepiku ozimego wymagała dłuższego - 12 tygodniowego okresu jaryzacji. Rośliny rzepiku jarego i kapusty pekińskiej z powodzeniem przechodziły ośmioletni okres wernalizacji, w fitotronie

wytwarzały bujne pędy kwiatowe. Natomiast dłuższego okresu jaryzacji niezbędnej do zainicjowania fazy generatywnej wymagają rośliny dwuletnie z rodzaju *Brassica* takie jak jarmuż, a szczególnie brukselka. Dla jarmużu stadium pięciu liści było odpowiednie do rozpoczęcia jaryzacji. Jednakże wystąpiły różnice odmianowe w długości czasu wernalizacji. Jak wynika z przeprowadzonych badań dla rozpoczęcia fazy generatywnej brukselki, w warunkach sztucznych, wymagane jest stadium roślin w fazie ponad 10 liści oraz 16 tygodni jaryzacji.

Cegielska-Taras 2002. Monografie i Rozprawy Naukowe 18/2002. *Kultura in vitro mikrospor w genetycznym ulepszaniu rzepaku ozimego (Brassica napus L.)*

Kopcewicz J. 2002. *Rozwój generatywny W: Fizjologia roślin (red. Kopcewicz Jan, Lewak Stanisław)*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

Wnioski

Wymagania jarowizacyjne roślin z rodzaju *Brassica* zależą od gatunku rośliny i stadium jej rozwoju. Szczególnie duże wymagania jarowizacyjne stwierdzono u kapusty warzywnej brukselskiej - 16 tygodni w fazie ponad 10 liści.

Ad. B. Badania nad otrzymaniem roślin mieszańcowych z obukierunkowych krzyżowań gatunków diploidalnych: *B. rapa* i *B. oleracea*.

Metody

Do krzyżowania międzygatunkowego wykorzystano metodę zapyłania *in vivo*, polegającą na nakładaniu pyłku formy ojcowskiej na znamienia słupka, głównie dla kierunku krzyżowania *B. rapa* z *B. oleracea*. Natomiast dla kierunku krzyżowania *B. oleracea* z *B. rapa* wykorzystano zapyłanie *in vitro*, które polegało na nanoszeniu pyłku na izolowane odcięte zalążnie w kulturze *in vitro*. Po 7, 12 i 15 dniach od zapylenia, zarówno słupków jak i zalążni, izolowano powiększone zalążki, które przeniesione zostały na pożywkę MS z 2% sacharozą z dodatkiem 0,2 mg/l BAP lub 10% wody kokosowej. W każdej kombinacji liczbę prawidłowo wykształconych zarodków obliczano w stosunku do wyłożonych powiększonych zalążków. Rozwinięte zarodki przeniesione zostały na pożywkę MS z kinetyną w celu regeneracji pędów.

Wyniki

Zapyłanie *in vivo*

W eksperymencie wykorzystano odmiany rzepiku jarego, ozimego oraz kapustę chińską i jarmuż tradycyjny oraz brukselkę. Po siedmiu dniach od zapylenia (dpz) 20 słupków k. chińskiej pyłkiem jarmużu z powiększonych zalążni wyizolowano 43 powiększone zalążki. Z wyizolowanych powiększonych zalążków nie rozwinęły się zarodki. Następnie z tej samej kombinacji krzyżówkowej z zapylnych 80 słupków po 12 dpz wyizolowano 90 powiększonych zalążków. Po przeniesieniu na pożywkę uzyskano jeden prawidłowo wykształcony zarodek. Także po 12 dpz z 66 słupków z krzyżowania rzepiku ozimego z jarmużem wyizolowano 45 powiększonych zalążków. Po przeniesieniu na pożywkę uzyskano 2 prawidłowo wykształcone zarodki. Natomiast z 40 zapylnych słupków, w krzyżowaniu brukselka × kapusta chińska, wyizolowano 44 powiększone zalążki, z których otrzymano jeden zarodek. Kolejne eksperymenty polegały na przeniesieniu powiększonych zalążków na pożywkę po 15 dpz. W tej kombinacji łącznie z zapylnych 386 słupków wyizolowano z zalążni 272 powiększone zalążki, z których po przeniesieniu na pożywkę rozwinęło się 15 zarodków, co stanowiło 5,5%. Były to krzyżowania rzepików jarych i ozimych, rzepiku i brukselki, odm. jarmużu oraz kapusty chińskiej.

Zapyłanie *in vitro*

W eksperymencie wykorzystano odmiany rzepiku jarego, ozimego oraz kapustę chińską i jarmuż tradycyjny oraz brukselkę.

Po 7 dpz z 16 zapylnych pyłkiem kapusty chińskiej zalążni jarmużu wyizolowano 60 powiększonych zalążków i przeniesiono na pożywkę MS. Z tych struktur nie rozwinęły się żadne zarodki. Podobny wynik uzyskano wykładając 12 zapylnych zalążni z krzyżowania brukselki × kapusta chińska - po 7 dpz wyizolowano na pożywkę MS 24 powiększone zalążki, z których również nie rozwinęły się zarodki. Natomiast z tej samej kombinacji krzyżówkowej po 12 dpz wyizolowano 12 powiększonych zalążków i po kilkunastu dniach rozwinął się jeden zarodek. Z zalążni brukselki po 12 dniach od zapylenia rzepikiem ozimym wyizolowano 34 powiększone zalążki, z których rozwinęły się trzy prawidłowo wykształcone zarodki. Kolejne powiększone zalążki z zapylnych zalążni izolowano po 15 dpz. Łącznie z 357 zapylnych zalążni wyizolowano 173 zalążki, z których na pożywkę MS rozwinęło się 8 zarodków, co stanowi ok. 4,6 %.

Wyniki zamieszczono w prezentacjach jako wykłady i plakat zał. nr 1, 2, 3.

Dyskusja

Materiałem do hybrydyzacji międzygatunkowej były podgatunki: *B. oleracea* i *B. rapa*, które są gatunkami ancestralnymi allotetraploidalnego rzepaku (*Brassica napus*) i krzyżują się bardzo trudno. Dlatego wykonano obukierunkowe krzyżowania *B. rapa* i *B. oleracea* poprzez zapylenie *in vivo* oraz *in vitro*. Olsson (1960) stwierdził, podczas krzyżowania międzygatunkowego roślin *Brassica* o nierównej liczbie chromosomów, drogą zapylenia *in vivo*, pożądany efekt uzyskuje się wówczas gdy forma mateczna posiada większą liczbę chromosomów niż forma ojcowska. *B. rapa* posiada $2n=20$, a *B. oleracea* $2n=18$. Natomiast odwrotnie, kiedy forma mateczna posiada mniej chromosomów krzyżowanie bardzo rzadko się udaje (Takeshita i in 1980). Powszechnie podkreślane są trudności w uzyskiwaniu zarodków mieszańcowych w kombinacji *B. oleracea* × *B. rapa* (Chen, Heneen 1989; Lu i in, 2001; Malek i in. 2012; Rahman 2004). W krzyżowaniach oddalonych istnieją bowiem bariery pre- i postzygotyczne (Zenkteler 1990, Sosnowska 2011). Bezpośrednie zapylenie *in vitro* załazni połączone z kulturą izolowanych zarodków we wczesnym etapie rozwoju może być przydatne w obejściu tych barier niezgodności, a tym samym możliwe jest uzyskanie mieszańców międzygatunkowych. Izolacja załazków z załazni po 7 dniach od zapylenia okazała się zbyt wczesna. Prawdopodobnie zarodki mieszańcowe znajdowały się w stadium kulistym zbyt wczesnym jak na dalszy rozwój w warunkach kultury *in vitro*. Jak wynika z uzyskanych wyników jedynie załazki izolowane z załazni po 12-15 dniach od zapylenia znajdują się w odpowiednim stadium do dalszego ich rozwoju. W literaturze spotyka się izolowanie załazków w bardzo różnych terminach od 10 dni nawet do 20 dni (Lu i in, 2001; Malek i in. 2012 Rahman 2004, Zhang i in. 2004). Dlatego konieczne są badania eksperymentalnie nad ustaleniem liczby dni od zapylenia przed wykładaniem załazków. Metoda kultury *in vitro* izolowanych zarodków we wczesnym stadium rozwoju (embryo rescue) pozwala przełamać bariery postzygotyczne, przede wszystkim związane z niedorozwojem bielma. Bez pomocy kultury *in vitro* taki zarodek ulega degeneracji. W niniejszych badaniach efektywność zapylenia *in vitro* obliczona stosunkiem wyłożonych załazków do uzyskanych zarodków, wynosiła 4,6%. Wydajność tej metody była podobna do uzyskania zarodków poprzez zapylenie, *in vivo*, która wynosiła 5,5%. Ten efekt uzyskano wykładając powiększone załazki na pożywkę MS z 2% sacharozą oraz dodatkiem 10% wody kokosowej i 0,2 mg/l BAP. Zarówno substancje biologicznie aktywne zawarte w wodzie kokosowej jak i dodatek fitohormonu BAP korzystnie wpływały na rozwój zarodków mieszańcowych. Z każdego zarodka przeniesionego na pożywkę w kulturze *in vitro* uzyskano roślinę.

Literatura

- Chen B-Y, Heneen W. 1989. Hereditas 111, 255-263
Lu C.M., Zhang B., Kakihara F., Kato M. Plant Breeding.120: 405-410.
Malek M.A., Ismail M.R., Rafii M.Y., Rahman M. 2012.The Scientific World Journal 2012 ID 416901, doi:1.1100/2012/416901.
Olsson G. 1960. Hereditas 46: 351-386.
Rahman M.N. 2004. Can.J.Plant Sci. 84: 965-969.
Sosnowska K. 2011. Rośliny Oleiste-Oilseed Crops, XXXII: 211-222.
Takeshita M., Kato M., Tokumasu S. 1980. Japan J Genet 55: 373-387.
Zenkteler M. 1990. CRC Crit Rev Plant Sci 9: 267-279.
Zhang G.Q., Tang G.X., Song W.J., Zhou W.J. 2004. Euphytica 140: 181-187.