



## Kultury *in vitro* izolowanych zarodków i zalążków z krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*

Andrzej Wojciechowski<sup>1</sup>, Janetta Maślankiewicz<sup>1</sup>, Yuping Chen<sup>2</sup>, Miła Kwapiszewska<sup>1</sup>, Błażej Springer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, Poznań

<sup>2</sup> Central China Agricultural University, China

### *In vitro* culture of isolated embryos and ovules from wide crosses within the genus *Brassica*

#### Summary

*In vitro* culture of hybrid embryos and ovules from crosses of *B. campestris*, *B. oleracea*, *B. fruticulosa* and *B. napus* were conducted on White, Murashige and Skoog, Murashige and Skoog modified by Keller and Nitsh and Nitsh media. The highest efficiency of crosses was obtained in the crosses *B. campestris* x *B. oleracea*, and the lowest in crosses with *B. fruticulosa*. In cultures of 572 embryos from 11 cross combinations, plants were regenerated from 24,5% of cultured embryos. From 3 cross combinations 502 ovules were placed on the medium. In this case the plants were regenerated from 2 of 3 crosses and the efficiency of the culture was over 46%.

#### Key words:

embryo culture, ovule culture, interspecific hybridisation.

#### Adres do korespondencji

Andrzej Wojciechowski,  
Katedra Genetyki  
i Hodowli Roślin,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Wojska Polskiego 71c,  
60-625 Poznań.

#### biotechnologia

2 (53) 86–89 2001

## 1. Wstęp

Kultury *in vitro* są często postrzegane jako narzędzia wspomagające metody klasycznej hodowli roślin. Znaczenie kultur *in vitro* doceniono, kiedy to Overbeek i in. (1,2) stwierdzili, że mleczko kokosowe dodane do pożywki stymuluje wzrost zarodków. Wyniki prezentowane w tej pracy dotyczą kultur zarodków i zalążków.-

## 2. Materiał i metoda

Materiał badawczy stanowiły zarodki mieszańcowe z krzyżowań oddalonych pomiędzy różnymi formami z gatunków *B. campestris*, *B. oleracea*, *B. napus* i *B. fruticulosa*. Kultury zarodków i zalążków prowadzono na pożywkach White'a (W), Murashige i Skooga (MS), Murashige i Skooga zmodyfikowanej przez Kellera (MS<sub>K</sub>) oraz Nitsha i Nitsha (H<sub>3</sub>). Zarodki izolowano w 24 dniu, a zalążki w 18 dniu od zapylenia krzyżowego.

Efektywność krzyżowania poszczególnych gatunków wyrażono płodnością i plennością. Efektywność kultur *in vitro* wyrażono liczbą zregenerowanych roślin, które prawidłowo rozwijały się w glebie w stosunku do liczby zarodków lub zalążków umieszczonych na pożywce.

## 3. Wyniki

### 3.1. Ocena efektywności krzyżowania

Krzyżowanie *B. campestris* ssp. *rapa* x *B. oleracea* var. *gongyloides* okazało się jedynym w wyniku którego nie otrzymano luszczyn (tab. 1). W przypadku trzech krzyżowań, tj. *B. fruticulosa* x *B. napus* f. *biennis*, *B. oleracea* var. *gongyloides* x *B. fruticulosa* i *B. napus* f. *biennis* x *B. campestris* ssp. *chinensis* skuteczność krzyżowania wyrażona płodnością wyniosła poniżej 6%. W pozostałych kombinacjach krzyżowań skuteczność krzyżowania wyniosła od 10,6 (*B. napus* f. *biennis* x *B. oleracea* var. *gongyloides*) do 75,0% (*B. campestris* ssp. *sarson* x *B. napus* f. *biennis*). Wysoka skuteczność krzyżowania wyrażona ilością zawiązanych luszczyn pozostawała dość często w kontraście z ilością zalążków, które zawierały zarodki. Przykładowo w kombinacji krzyżowania, gdzie najwięcej zapylnych kwiatów zawiązało luszczyny (75%), liczba zalążków zawierających zarodki była mała i stanowiła zaledwie 0,8% ogólnej liczby zalążków znajdujących w luszczynach (*B. campestris* ssp. *sarson* x *B. napus* f. *biennis*). Z kolei w krzyżowaniu *B. napus* f. *biennis* x *B. campestris* ssp. *chinensis*, gdzie skuteczność krzyżowania wyniosła zaledwie 5,7%, procent zalążków zawierających zarodki wyniósł 56,8.

Tabela 1

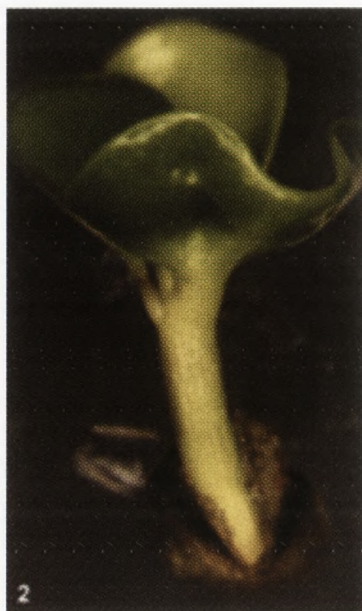
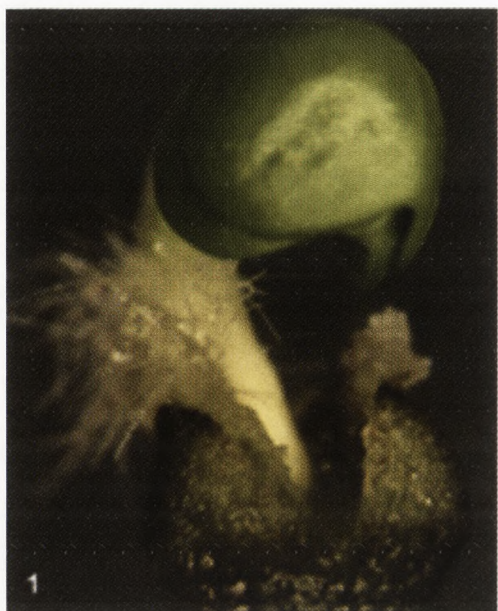
Efektywność krzyżowania oddalonego w obrębie rodzaju *Brassica* wyrażona płodnością (liczba fusczyń/liczba zapylnych kwiatów) i plennością (liczba zalążków z zarodkami/ogólną liczbę zalążków) oraz skuteczność kultur *in vitro* zarodków i zalążków

Kombinacja krzyżowania		Płodność (%)	Plenność		Liczba zarodków lub zalążków* umieszczonych na pożywce	Zregenerowane rośliny – (%) liczby zarodków umieszczonych na pożywce	
Forma mateczna	Forma ojcowska		Liczba zalążków ogółem	zalążki z zarodkami (%)			
<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	51,6	64	53,1	34	129,4	
	var. <i>italica</i>	28,0	2	100,0	2*	50,0	
	<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	30,1	67	6,0	4	0,0	
	ssp. <i>rapa</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	0,0	0	0,0	–	–
		<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	43,5	86	24,4	21	0,0
		<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	75,0	121	0,8	1	0,0
ssp. <i>sarson</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	50,0	45	15,6	–	–
		ssp. <i>rapa</i>	25,0	7	0,0	–	–
		<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	40,6	803	12,5	100	67,1
		f. <i>annua</i>	36,4	86	29,1	25	24,0
		<i>B. fruticulosa</i>	3,0	2	0,0	–	–
		var. <i>italica</i> <i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	17,6	21	0,0	21*	0,0
<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i> ssp. <i>Rapa</i>	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	5,7	44	56,8	25	3,1
		ssp. <i>Rapa</i>	33,3	115	75,7	87	3,9
		<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	10,6	169	79,9	135	64,7
	var. <i>italica</i>	55,4	479	62,2	479*	46,5	
	<i>B. fruticulosa</i>	15,5	207	19,8	41	0,0	
	f. <i>annua</i> <i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	<i>B. campestris</i> ssp. <i>sarson</i>	48,4	148	66,9	99	1,0
		<i>B. napus</i> f. <i>biennis</i>	2,4	10	0,0	–	–

\* liczba zalążków umieszczonych na pożywkach

### 3.2. Ocena efektywności kultur zarodków i zalążków

Ogółem izolowano 572 zarodki z jedenastu kombinacji krzyżowań (tab. 1). W pełni rozwinięte rośliny zregenerowano z zarodków mieszańcowych pochodzących z 7 kombinacji krzyżowań i stanowiły one 24,5% zarodków umieszczonych na pożywce. Najwyższą efektywność kultur zarodkowych otrzymano w krzyżowaniu *B. campestris* ssp. *chinensis* x *B. oleracea* var. *gongyloides* (100%), a najniższą w krzyżowaniu *B. napus* f. *annua* x *B. campestris* ssp. *sarson* (1,0%).



Fot. 1 i 2. Normalnie rozwinięte zarodki mieszańcowe *B. napus* f. *biennis* x *B. oleracea* var. *italica*, wysuwające się z załączków po 3 tygodniach inkubacji na pożywce MS.



W kombinacjach krzyżowań, w których jedną z form rodzicielskich stanowiła *B. oleracea* var. *italica*, zarodki zamierały przed osiągnięciem stadium serca i w celu ich uchronienia przed zamieraniem zastosowano kultury zalążkowe. Po 3-4 tygodniach inkubacji ściany zalążków pękały i na zewnątrz wysuwały się w pełni rozwinięte zarodki (fot. 1, 2). Skuteczność kultur zalążkowych była stosunkowo wysoka i wyniosła od 46,5 do 50,0% (tab. 1).

#### 4. Dyskusja

W wielu krzyżowaniach oddalonych otrzymanie roślin mieszańcowych w warunkach naturalnych jest trudne ze względu na występujące bariery przed i postzygotyczne. Postzygotyczne bariery można pokonać za pomocą kultur zarodkowych (3).

Technika kultur zarodkowych dla *Brassica* została przystosowana przez Nishi'ego i in. w 1959 r. (4). Od tego czasu kultury zarodków mieszańcowych były często używane dla otrzymania mieszańców oddalonych w rodzaju *Brassica* (5). W krzyżowaniach oddalonych, w których zarodki zamierają we wczesnych stadiach rozwojowych pomocne mogą być kultury zalążkowe. Ważne jest, aby właściwie uchwycić początek degeneracji zalążków. Według różnych badaczy najlepszy moment dla izolowania zalążków mieści się pomiędzy 10 a 30 dniem od zapylenia (3,6,7) i jest on w największym stopniu uzależniony od krzyżowanych genotypów (8).

#### Literatura

1. van Overbeek J., Conklin M. E., Blakeslee A. F., (1941), *Science*, 94, 350-351.
2. van Overbeek J., Siu R., Haagen-Smith A. J., (1944), *Amer. J. Botany*, 31, 219-224.
3. Diederichsen E. M., Sacristian D., (1994), *Plant Breeding*, 113, 79-82.
4. Nishi S., Kawata J., Toda M., (1959), *Japan J. Breed.*, 8, 215-222.
5. Sjödin C., (1992), *Acta Agri. Scand., Sect. B., Soil Sci.*, 42, 197-207.
6. Ayotte R., Harney P. M., Machado V. S., (1987), *Euphytica*, 36, 615-624.
7. Mohapatra D., Bajaj Y. P. S., (1987), *Euphytica*, 36, 321-326.
8. Wojciechowski A., (1985), *Genetica Polonica*, 26, 4, 423-436.