

**Podsumowanie realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku**

Tytuł zadania:

**Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica***

Kierownik zadania: dr Piotr Kamiński

Współwykonawcy: dr hab. Michał Starzycki, dr Tomasz Książczyk, dr hab. Małgorzata

Podwyszyńska, mgr Katarzyna Nowak, mgr Elżbieta Starzycka-Korbas, prof. dr hab. Elżbieta U. Kozik

**Cel projektu:**

Projekt dotyczy wytworzenia nowych genotypów w wyniku prowadzenia zamierzonych i celowych krzyżowań pomiędzy uprawnymi formami z rodzaju *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* a genotypami oddalonymi i dzikimi. Prowadzona będzie ocena nowo wytworzonych form mieszańcowych pod względem cech anatomicznych, morfologicznych oraz cytologicznych, pod względem zdolności do rozmnażania generatywnego w warunkach kontrolowanych a także przydatności nowych form użytkowych do badań hodowlanych warzyw kapustowatych, jako źródła cennych gospodarczo cech jakościowych oraz odporności na stesy biotyczne i abiotyczne.

Badania prowadzone w roku 2016 miały następujące cele szczegółowe:

1. Otrzymanie roślin pokolenia BC<sub>1</sub> w wyniku krzyżowań międzygatunkowych mieszańców *B. oleracea* x *B. napus* z liniami rodzicielskimi *B. oleracea* przy wykorzystaniu technik *in vitro*.
2. Przeprowadzenie adaptacji międzygatunkowych roślin pokolenia BC<sub>1</sub> do warunków uprawy w szklarni, doprowadzenie do fazy rozwojowej umożliwiającej ich jarowizację.
3. Otrzymanie drugiego pokolenia wypierającego mieszańców międzygatunkowych *B. napus* x *B. rapa* a także wytworzenie nowych mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* z dzikimi formami roślin kapustowatych.
4. Charakterystyka cech morfologicznych, anatomicznych i cytologicznych mieszańców alloplazmatycznych *B. oleracea* x *B. napus*
5. Ocena polowa wartości użytkowej nowo wytworzonych mieszańców międzygatunkowych *B. napus* x *B. rapa*, *B. oleracea* i gatunków dzikich.

**Ad.1. Otrzymanie roślin pokolenia BC<sub>1</sub> w wyniku krzyżowań międzygatunkowych mieszańców *B. oleracea* x *B. napus* z liniami rodzicielskimi *B. oleracea* przy wykorzystaniu technik *in vitro*.**

Program badań obejmował krzyżowania wypierające/międzygatunkowe genotypów w rodzaju *Brassica* (*B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa* oraz *B. taurica*) zgromadzonych i rozmnażanych generatywnie w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych INHORT, Skierniewice oraz Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR-PIB w Poznaniu w celu poszerzenia puli genetycznej uprawianych gatunków roślin kapustowatych. Materiałem do przeprowadzenia badań w roku 2016 było dwanaście mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* x *B. napus* otrzymanych w roku 2014 i ocenionych pod względem cech anatomicznych i morfologicznych w roku 2015.

Do prowadzenia krzyżowań wstecznych zostały wyselekcjonowane dwie formy rodzicielskie kapusty głowiastej białej (*B. oleracea*), (CKA25.1, CIW7.38) oraz linia wsobna kapusty pekińskiej 433 (*B. rapa*), która zastąpiła planowaną początkowo linię jarmużu (ZGH02) o słabej zdolności do wiązania nasion i wysokim poziomie samonieźgodności. Każdy z genotypów przeznaczony do krzyżowań wypierających był reprezentowany przez 1-3 rośliny, prawidłowo zjarowizowane oraz wytwarzające wystarczającą liczbę pędów generatywnych. Prowadzenie krzyżowań oddalonych, kierunek

krzyżowania oraz wybór komponentów rodzicielskich był uzależniony od synchronizacji terminów kwitnienia, dostępności odpowiedniej liczby kwiatów i pąków kwiatowych, występowania cechy męskiej sterylności oraz innych czynników w trakcie wegetacji.

Łącznie wykonano 25 krzyżowań wstecznych, z których wyizolowano 63 zarodki.

Klonowanie roślin pokolenia  $F_1$  mieszańców międzygatunkowych w warunkach *in vitro* było prowadzone tylko dla wybranych żywych, prawidłowo rozwijających się i różnicujących się zarodków. Odnotowano dużą śmiertelność części zarodków otrzymanych w wyniku krzyżowania wstecznego mieszańców międzygatunkowych (*B. napus* x *B. oleracea*) z genotypami kapusty głowiastej białej (*B. oleracea*). Śmiertelność tych zarodków była wyraźnie związana z genotypem matecznym i objawiała się zanikiem chlorofilu w trakcie prowadzenia regeneracji zarodków w różnych fazach rozwojowych. Genotypy z brakiem chlorofilu nie zostały przekazane do dalszych badań.

Liczba otrzymanych zarodków form mieszańcowych dla poszczególnych krzyżowań wstecznych była zróżnicowana i wahała się od jednego do siedmiu. Dla trzynastu spośród dwudziestu pięciu krzyżowań międzygatunkowych w trakcie regeneracji następowało bardzo silne zamieranie zarodków, związane z zanikiem chlorofilu w trakcie regeneracji na pożywkach. Proces ten było obserwowany głównie dla zarodków uzyskanych w wyniku krzyżowania wstecznego mieszańców międzyrodzajowych *B. oleracea* x *B. napus* z liniami wsobnymi kapusty głowiastej białej (*B. oleracea*). Zregenerowane i żywotne zarodki dla tego typu krzyżowań otrzymano jedynie dla sześciu kombinacji a liczba zarodków wahała się od jednego do dwóch. Znacznie lepszy rezultat uzyskano dla krzyżowań wstecznych mieszańców międzyrodzajowych *B. oleracea* x *B. napus* z linią wsobną kapusty pekińskiej gdzie zregenerowane zarodki w liczbie od jednego do czterech uzyskano dla sześciu spośród siedmiu kombinacji. W rezultacie przeprowadzonych badań uzyskano 19 zregenerowanych roślin pokolenia  $BC_1$ : 8 dla krzyżowań międzygatunkowych (*B. oleracea* x *B. napus*) x *B. oleracea* oraz 11 roślin dla krzyżowań (*B. oleracea* x *B. napus*) x *B. rapa*, które przekazano do Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach do dalszej hodowli.

## **Ad.2 Przeprowadzenie adaptacji międzygatunkowych roślin pokolenia $BC_1$ do warunków uprawy w szklarni, doprowadzenie do fazy rozwojowej umożliwiającej ich jarowizację.**

Materiał do badań stanowiło 19 mieszańców pokolenia  $BC_1$  (*B. napus* x *B. oleracea*) x *B. oleracea* oraz (*B. napus* x *B. oleracea*) x *B. rapa* uzyskanych w wyniku krzyżowań międzygatunkowych mieszańców pokolenia  $F_1$  z wyselekcjonowanymi roślinami dwuletnich form uprawnych *B. oleracea* i *B. rapa* otrzymanych w wyniku zastosowania techniki izolowanych zarodków. Hodowla hydroponiczna prowadzona była w warunkach kontrolowanych zgodnie z metodyką opracowaną przez prof. M. Starzyckiego dla genotypów rzepaku, przy 12 godzinnym doświetlaniu i w temperaturze 18-21 °C (noc/dzień). Po 14-20 dniach, mieszańce, które wytworzyły wystarczająco silny system korzeniowy zostały przesadzone z hydroponik do substratu torfowego i stopniowo adoptowane do warunków uprawy w szklarni w temperaturze 10-22 °C. Rośliny rozmnożono wegetatywnie poprzez klonowanie dzieląc na 2 lub 3 sadzonki. Ukorzenione rośliny umieszczano w 0,5 l doniczkach z substratem torfowym w których będą przechodziły jarowizację w sezonie jesienno zimowym.

Przeprowadzona adaptacja pozwoliła na otrzymanie w pełni wykształconych i rozwiniętych roślin które charakteryzowały się dobrą zdrowotnością, wigorem oraz brakiem anomalii rozwojowych. Zdolność do podjęcia jarowizacji wszystkie genotypy osiągnęły w fazie 14-18 liści właściwych gdy szerokość szyjki korzeniowej wynosiła około 6 mm. Klonowanie a następnie ukorzenianie otrzymanych sadzonek pozwoliło na uzyskanie 20 genotypów dla pokolenia  $BC_1$  (*B. napus* x *B. oleracea*) x *B. oleracea* oraz 20 genotypów dla pokolenia (*B. napus* x *B. oleracea*) x *B. rapa*. Liczba roślin dla każdego z zaadaptowanych mieszańców wynosiła od trzech do czterech. 40 roślin pokolenia  $BC_1$  rozpoczęło jarowizację w pierwszym tygodniu grudnia, w temperaturze do 4-8 °C przy zachowaniu naturalnego fotoperiodu.

## **Ad.3 Otrzymanie drugiego pokolenia wypierającego mieszańców międzygatunkowych *B. napus* x *B. rapa* a także wytworzenie nowych mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* z dzikimi formami roślin kapustowych.**

Materiałem do przeprowadzenia badań w roku 2016 było osiem najwartościowszych mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* x *B. napus*, oraz sześć mieszańców *B. rapa* x *B. napus* pokolenia  $BC_1$ , otrzymanych w roku 2015, odznaczających się wysoką zdrowotnością i wigorem, rozmnażanych generatywnie w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych. Wybrana populacja była silnie zróżnicowana pod względem pochodzenia, cech anatomiczno-morfologicznych, użytkowych, terminu

osiągania dojrzałości zbiorczej oraz wyrównania wewnątrzliniowego. Prowadzenie krzyżowań oddalonych dla form dwuletnich wymagało zastosowania technik wernalizacji dostosowanych do wymagań poszczególnych genotypów w celu uzyskania odpowiedniej synchronizacji terminów kwitnienia komponentów rodzicielskich. Wykorzystano techniki hodowli konwencjonalnej takie jak zapylenia w pąku, zapylenia na otwartym kwiecie, krzyżowania proste, krzyżowania odwrotne oraz wsteczne. Badania prowadzono w warunkach szklarniowych przy wykorzystaniu donic uprawowych ustawionych na podłożu torfowym oraz izolatorów foliowo-pergaminowych zapewniających izolację pędów kwiatostanowych. Wszystkie wykorzystane do zapyleń rośliny odznaczały się dobrym wigorem, zdrowotnością oraz prawidłową budową organów generatywnych. Dla każdego z sześciu genotypów pokolenia  $BC_1$  ( $B. napus \times B. rapa$ )  $\times B. rapa$  wykonano cztery krzyżowania lub zapylenia wsteczne (razem 24). Wykonano również krzyżowania pomiędzy ośmioma mieszańcowymi genotypami  $B. napus \times B. oleracea$  wyselekcjonowanymi z liniami wsobnymi kapusty głowiastej białej (16) i zapylenia wsobne/siostrzane linii wypierających kapusty głowiastej białej (10) jako wzorca zdolności do wytwarzania nasion. Wykonano również krzyżowania wsteczne ( $BC_2$ ) dla mieszańców  $B. rapa \times B. napus$  (24) oraz kontrolne zapylenia wsobne linii wypierających kapusty pekińskiej (10). Dla otrzymania 24 krzyżowań wstecznych ( $BC_1$ ) mieszańców międzygatunkowych  $B. napus \times B. oleracea$  formami wypierającymi były męskosterylne linie kapusty głowiastej białej. Po wykonaniu zapyleń krzyżowych męskosterylnych linii kapusty głowiastej białej oraz mieszańców międzygatunkowych  $B. napus \times B. oleracea$  obserwowano wprawdzie inicjację rozwoju nasion, wzrost elongacyjny łuszczyń i pojawienie się 1mm zawiązków, jednak po 3 tygodniach od zapylenia, zawiązki te bieleły a następnie zasychały. Pomimo wielokrotnie powtarzanych zapyleń krzyżowych, zarówno w fazie zielonego pąka jak i na otwartym kwiecie, dla żadnej kombinacji nie uzyskano w pełni wykształconych nasion pokolenia  $BC_1$ . Spośród ośmiu mieszańców międzygatunkowych  $B. napus \times B. oleracea$  zapylnych wsobnie uzyskano jedynie pojedyncze, słabo wypełnione nasiona dla trzech genotypów. Linie wypierające kapusty głowiastej białej przy zapyleniu siostrzanym przy pomocy męskopłodnych linii wypierających wiązały nasiona w stopniu dobrym. W odróżnieniu od krzyżowań wypierających z  $B. oleracea$ , otrzymanie nasion drugiego pokolenia wstecznego ( $B. rapa \times B. napus$ )  $\times B. rapa$  z liniami wypierającymi  $B. rapa$  przebiegało bez problemów, zarówno przy zapyleniu w pąku jak i na otwartym kwiecie. W rezultacie dla wszystkich genotypów otrzymano wystarczającą liczbę nasion pokolenia  $BC_2$  umożliwiającą ocenę uzyskanych materiałów w doświadczeniu polowym w roku 2017.

#### **Ad.4 Charakterystyka cech morfologicznych, anatomicznych i cytologicznych mieszańców alloplazmatycznych $B. oleracea \times B. napus$ .**

Celem zadania była ocena nowo wytworzonych mieszańców międzygatunkowych  $B. oleracea \times B. napus$  pod względem cech anatomicznych, morfologicznych i cytologicznych. Przeprowadzona ocena posłużyła do selekcji genotypów o najwartościowszych cechach użytkowych które mogą być wykorzystane w dalszych krzyżowaniach wstecznych z formami użytkowymi warzyw kapustowatych. Założony cel został osiągnięty w całości. Materiał do badań stanowiły mieszańce międzygatunkowe otrzymane w roku 2014 metodą izolowanych zarodków oraz metodami hodowli klasycznej a także 21 nowych międzygatunkowych mieszańców uzyskanych techniką izolowanych zarodków w roku 2015. Każdy z ocenianych genotypów został rozmnożony wegetatywnie przez klonowanie i był reprezentowany przez 2 do 6 roślin. Jarowizacja została przeprowadzona w sezonie zimowym 2015/2016 w temperaturze 4-6 °C przy zachowaniu naturalnego fotoperiodu. W pierwszej dekadzie marca 2016 zjarowizowane rośliny przesadzono do 5 litrowych doniczek ustawionych na podłożu torfowym w szklarni. Dla 20 genotypów reprezentujących wszystkie typy krzyżowań międzygatunkowych dokonano analizy cech morfologiczno-anatomicznych całych roślin (pokrój, położenie liści, grubość łodygi, wielkość liści, typ liścia, kształt, szerokość, barwa, powierzchnia blaszki liściowej, nalot woskowy, unerwienie, brzeg liścia) oraz ich organów generatywnych z uwzględnieniem dysfunkcji związanych z męską sterility (wysokość roślin, początek kwitnienia, kształt i długość pąka, wielkość kwiatu, ułożenie, barwa, kształt płatków, obecność/brak pyłku). Jednocześnie dokonano oceny wielkości ziaren pyłku przy pomocy mikroskopu świetlnego oraz obliczono % zniekształconych ziaren dla każdego obiektu. Dla dwunastu mieszańców  $B. oleracea \times B. napus$  otrzymanych w roku 2014 oraz dla dwudziestu jeden genotypów otrzymanych w roku 2015 i ich form rodzicielskich (7 genotypów) oceniono zawartość jądrowego DNA (wielkość genomu) przy użyciu cytometru przepływowego. Zoptymalizowaną metodą przebadano łącznie 40 genotypów (400 analiz).

Dwanaście mieszańców *B. oleracea* × *B. napus* otrzymanych w roku 2014 oraz siedem form rodzicielskich (*B. oleracea* - 5, *B. napus* - 2) powstałych z kontrolowanych krzyżowań diploidalnych form obu gatunków, hodowanych w warunkach szklarniowych wytypowano do zbadania metodą FISH (razem około 54 rośliny).

*Ocena zawartości jądrowego DNA (wielkość genomu) mieszańców B. rapa i B. napus oraz B. oleracea i B. napus metodą cytometrii przepływowej (FCM)*

Analiza FCM przeprowadzona z wykorzystaniem standardu wewnętrznego *Zea mays* (2C=5,43 pg) wykazała, że wielkości genomów (2C) u linii *B. napus* były podobne i wynosiły około 2,5 pg. Także wielkości genomów poszczególnych genotypów *B. oleracea* oraz *B. rapa* nie różniły się między sobą i wynosiły około 1,49 pg. dla *B. oleracea* i 1.1 dla *B. rapa*. Wartości te były zbliżone do wartości referencyjnych podawanych w literaturze dla w.w. genomów. Badane mieszańce międzygatunkowe różniły się między sobą pod względem średniej zawartości jądrowego DNA. Ze względu na zawartość DNA można było podzielić je na następujące grupy:

- 1) mieszańce o średniej zawartości DNA 1,5 pg. typowej dla *B. oleracea*,
- 2) mieszańiec uzyskany w wyniku krzyżowania linii *B. napus* i *B. rapa*, który reprezentował pośrednią dla genomów rodzicielskich zawartość jądrowego DNA 1,79 pg.,
- 3) mieszańce uzyskane w wyniku krzyżowania linii *B. napus* i *B. oleracea* o średniej zawartości DNA 2,0 pg.,
- 4) mieszańce o średniej zawartości DNA typowej dla *B. napus* 2,5 pg.,
- 5) mieszańiec uzyskany w wyniku krzyżowania linii cms rzepaku i linii kapusty głowiastej białej (*B. napus* × *B. oleracea*) o średniej zawartości DNA 2,73 pg.,
- 6) dwa mieszańce uzyskane w wyniku zapylenia wsobnego/krzyżowego linii *B. napus* × *B. oleracea* o średniej zawartości DNA 3.96 pg.

Otrzymane wielkości genomów dla poszczególnych grup mieszańców pozwalają na szacunkowe określenie ich konstrukcji/charakterystyki biorąc za odniesienie znaną masę DNA jądrowego i znaną konstrukcję genomów rodzicielskich, które są ze sobą blisko spokrewnione.

*Cytogenetyczna identyfikacja mieszańców Brassica oleracea × Brassica napus (18 genotypów – 12 mieszańców i 6 form rodzicielskich)*

Przeprowadzono analizy cytogenetyczne, przy wykorzystaniu techniki rDNA-FISH, celem identyfikacji niektórych chromosomów (= chromosomów markerowych) gatunków rodzicielskich u allopoliploidalnych mieszańców, a także określenia zmienności w liczbie i dystrybucji loci rDNA (= wzór loci rDNA) w badanych genomach. Wyniki tej analizy przedstawiono w Tabeli 7 i 8. Wśród form rodzicielskich, wzór loci rDNA u 2 odmian *B. napus* ('PN 1162', 'CPN 1398') i 4 odmian *B. oleracea* ('jarmuż', 'CKA25.1', 'J13' i 'Cavalo nero') nie odbiegał od wzoru spotykanego w literaturze. Wzór loci rDNA obserwowany u gatunku *B. taurica* jest rzadko spotykany; poza znaną liczbą i rozkładem typowych loci rDNA u *B. oleracea*, tj. parą sygnałów 5S rDNA (chromosom typu IV; C4) i dwoma parami sygnałów 35S rDNA (chromosomy typu VI i VII; C7 i C8), obserwowano dodatkową parę loci 35S rDNA w chromosomach typu IV. W jądrach komórek międzygatunkowych mieszańców *B. oleracea* × *B. napus* obserwowano 6–8, 11 i 14 sygnałów 5S rDNA, przy czym przeważały rośliny z 6 sygnałami 5S rDNA. Liczba loci 35S rDNA była zmienna i obserwowano 7–10, 13 i 17 sygnałów; przeważały komórki posiadające 8 sygnałów 35S rDNA. Analiza rDNA-FISH umożliwiła identyfikację homologów chromosomów niosących podstawowe, proksymalne i przytelomerowe loci 5S rDNA (chromosomy typu I, II i V - genom A oraz typu IV - genom C) oraz homologów chromosomów niosących loci 35S rDNA, zlokalizowane w przewężeniu wtórnym, proksymalnym i przytelomerowym (chromosomy typu I, II i VIII - genom A oraz typu IV, VI i VII - genom C). Spośród 11 badanych mieszańców, w komórkach 5 genotypów obserwowano 28 chromosomów (S1, S3, S6, S18 i S20; Ryc. 1B), w komórkach kolejnych 4 genotypów – 29 chromosomów (S2, S8, S15 i S22; Ryc. 1C), a u 2 pozostałych genotypów, tj. S14 i X20, obserwowano odpowiednio 47 i 74 chromosomy. Na podstawie wzoru loci rDNA określono sugerowaną konstytucję genomową badanych mieszańców; rośliny z 28 i 29 chromosomami mogą posiadać jeden genom A i dwa genomy C (ACC), podczas gdy rośliny z 47 i 74 chromosomami mogą posiadać odpowiednio dwa genomy A i trzy genomy C (AACCC; Ryc. 1D) oraz dwa genomy A i sześć genomów C (AACCCCCC). Genom mieszańca S3 posiadał 1 homolog chromosomu typu I (A3), 2 homologi chromosomu typu II (A1), 2 zmienione homologi chromosomu typu IV (C4\*), 1 homolog chromosomu typu V (A10), po 2 homologi chromosomów typu VI i VII (odpowiednio C8 i C7) oraz 1 homolog chromosomu typu VIII (A5/A6/A9). W genomie tego mieszańca obserwowano addycję dwóch loci 35S rDNA. Jedynie

mieszaniec S14 nie wykazywał obecności homologów chromosomu typu VIII, a z kolei u mieszańca S6, poza parą homologów chromosomu typu IV (C4), odnotowano jeden chromosom zmienionego homologu chromosomów typu IV (C4\*), posiadającego dodatkowo locus 35S rDNA. Przeprowadzone badania wykazały, że wśród 11 międzygatunkowych mieszańców odnotowano 8 różnych wzorów loci rDNA, a oczekiwany wzór liczby i dystrybucji sygnałów rDNA, przy założeniu konstytucji genomowej ACC (6 loci 5S rDNA, 8 loci 35S rDNA, w tym 3 chromosomów z kolokalizacją obu rodzajów rDNA; w skrócie 6/8/3), obserwowano jedynie u 36% badanych mieszańców, podczas gdy wzór 7/8/4 – u 18% mieszańców. Następujące wzory loci rDNA: 6/7/2, 6/10/2, 7/8/4 i 8/9/4 obserwowano każdorazowo u 9% badanych mieszańców. Zmienione wzory loci rDNA występowały z częstotliwością 9%, ale razem stanowiły 36% obserwowanych wzorów loci rDNA i, tym samym, było to 5 genotypów, u których odnotowano 17 przemian typów chromosomów. Zmiana jednego typu chromosomu występowała u 27% badanych mieszańców. Spośród obserwowanych typów chromosomów *Brassica*, to pochodzące z genomu A chromosomy typu II (33%) ulegały najczęstszym przekształceniom strukturalnym (addycje i delecje loci rDNA), w tym 66% przekształceń dotyczyło jednoczesnej amplifikacji sygnałów 5S i 35S rDNA. Pozostałe przekształcenia stanowiły 67% i dotyczyły chromosomów genomu C (chromosomy typu IV - 41,6% i VII - 16,6%) oraz pojedynczych chromosomów genomu A i C (w sumie 41,8%).

*Analiza form mieszańcowych w warunkach szklarniowych w fazie wegetatywnej i generatywnej pod względem cech morfologicznych i użytkowych.*

Dwadzieścia międzygatunkowych mieszańców ocenianych pod względem cech morfologicznych w fazie wegetatywnej i w fazie generatywnej stanowiło bardzo zróżnicowaną populację, jednak genotypy o tym samym pochodzeniu posiadały wiele cech wspólnych. Mieszańce *B. napus* x *B. oleracea* w fazie wegetatywnej charakteryzowały się liropodobnym typem liścia, z wyjątkiem genotypów S14R<sub>2</sub> oraz S7R<sub>2</sub> i S16R<sub>2</sub>, których liście przypominały rzepak i były lirowate. Różnice morfologiczne pomiędzy mieszańcami *B. napus* x *B. oleracea* dotyczyły głównie brzegu, unerwienia, stopnia pęcherzykowatości i wielkości liści, co mogło być związane z ich różnym pochodzeniem (kapusta biała, jarmuż, kapusta czarna, *B. taurica*). Genotypy S14R<sub>2</sub> oraz S15xS2 charakteryzowały się największą średnicą roślin oraz wyraźnie większą i szerszą blaszką liściową. Genotypy IW10, B1/7/4, ZGH02 oraz mieszańce X1 i S12 posiadały budowę liści typową dla *B. oleracea* (cały siedzący lub z ogonkiem), choć pod względem pozostałych cech anatomicznych dotyczących brzegu, powierzchni, barwy i unerwienia blaszki liściowej były silnie zróżnicowane.

Początek kwitnienia poszczególnych genotypów był zróżnicowany i trwał od drugiej połowy lutego do końca czerwca 2016 roku. Międzygatunkowe mieszańce *B. napus* x *B. oleracea* (S1, S2, S3, S6, S8, S9, S18, S14R<sub>1</sub>) kwitły najwcześniej od 20 lutego do 1 tygodnia marca, najpóźniej, w 1 i 2 tygodniu kwietnia zakwitły mieszańce S14R<sub>2</sub>, S15xS2. Wszystkie mieszańce wytwarzały kwiaty z wyraźnie wykształconymi pylnikami z widocznym pyłkiem. Większość kwitnących mieszańców *B. napus* x *B. oleracea* charakteryzowała się największą spośród wszystkich genotypów wysokością roślin od 180 do 200 cm. Mieszańce te charakteryzowały się średniej wielkości pąkami i kwiatami o ciemnożółtej barwie oraz okrągłym lub owalnym kształtem płatków korony. Cztery genotypy *B. oleracea* odznaczały się wąskoowalnym kształtem płatków o jasnożółtej barwie. Największe kwiaty o średnicy 27-29 mm wytwarzały międzygatunkowe mieszańce pokolenia R<sub>2</sub> S14 oraz S15xS2.

Oceniane genotypy różniły się średnią wielkością oraz procentowym udziałem zniekształconych ziaren pyłku. Rośliny mieszańcowe *B. napus* x *B. oleracea* charakteryzowały się większymi ziarnami pyłku od 31,5 (S7R1) do 38,4 µm (S14R2) w porównaniu do linii *B. oleracea*, *B. rapa* i *B. napus* które wytwarzały ziarna pyłku średnio od 21,04 µm (ZGH02) do 28,04 µm (S16). Zauważalną różnicą pomiędzy międzygatunkowymi mieszańcami *B. napus* x *B. oleracea* a formami wyjściowymi był procentowy udział zniekształconych ziaren pyłku, który dla większości mieszańców wynosił od 77,5 (S14R<sub>1</sub>) do 93,1% (S6). Wyjątek stanowiły jedynie trzy genotypy mieszańcowe pokolenia R<sub>2</sub> (S7, S14 i S15xS2), których pyłek był wykształcony prawidłowo. Dla form rodzicielskich *B. oleracea* i *B. rapa* udział procentowy nietypowych i zniekształconych ziaren pyłku nie przekraczał 8%.

*Rozmnożenie generatywne form hybrydowych przez zapylenie wsteczne lub wsobne przy wykorzystaniu technik hodowlanych.*

W wyniku zapyleń wsobnych i krzyżowych form mieszańcowych *B. oleracea* x *B. napus* otrzymano pojedyncze nasiona dla 17 kombinacji. Wydajność tworzenia nasion była bardzo niska a luszczyny z zawiązanymi pojedynczymi nasionami pojawiały się sporadycznie dopiero po wielokrotnym

powtórzeniu danego zapylenia w kilku terminach na kolejnych pędach generatywnych. Dla dwóch genotypów pokolenia R<sub>2</sub> (S14R<sub>2</sub>, S15xS2) uzyskano pojedyncze, w pełni wykształcone nasiona pokolenia R<sub>3</sub>. Dla sześciu mieszańców pokolenia R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> zapylnych pyłkiem linii kapusty pekińskiej (*B. rapa*) otrzymano również pojedyncze nasiona. Dla męskosterylnego genotypu X20 zapylanego pyłkiem form mieszańcowych pokolenia R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> nie uzyskano nasion.

#### **Ad. 5 Ocena polowa wartości użytkowej nowo wytworzonych mieszańców międzygatunkowych *B. napus* x *B. rapa*, *B. oleracea* i gatunków dzikich.**

Ocenie poddano 25 eksperymentalnych mieszańców międzygatunkowych otrzymanych w roku 2015 i 2014 w wyniku zamierzonych krzyżowań pomiędzy oddalonymi gatunkami z rodzaju *Brassica* przy zastosowaniu tradycyjnych metod hodowlanych, dla których otrzymano wystarczającą liczbę nasion. Komponenty rodzicielskie pochodziły z kolekcji zgromadzonej w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych, powstałej w wyniku swobodnego lub celowego przepylenia wybranych dzikich i użytkowych form *B. oleracea*, *B. napus* i *B. rapa* i włączonej do programu badawczego w celu wykorzystania przy tworzeniu nowych mieszańców międzygatunkowych.

W trakcie okresu wegetacji zaobserwowano duże zróżnicowanie badanych cech między genotypami. 21 genotypów charakteryzowało się dwuletnim cyklem rozwojowym, pozostałe cztery wybiły w pędę kwiatostanowe. Oceniane formy różniły się średnicą roślin – od 36 cm do 85 cm, wysokością – od 17 cm (PL203x433) do 56 cm ((PN 1162/6 x SP) x SP). Badane genotypy wytworzyły łodygi zróżnicowane pod względem wysokości – od 2 cm do 25 cm i grubości – od 2 cm do 12 cm. W badanej populacji wystąpiło duże zróżnicowanie cech morfologicznych liści. 24 genotypy posiadały liście z ogonkiem, tylko ((CPN1198 x CH4/2) x CH4/2) posiadał liście o typie siedzącym. Dziewiętnaście obiektów charakteryzowało się średnią szerokością blaszki liściowej (20 – 30 cm), pozostałe sześć – małą (poniżej 20 cm). Wśród badanych form 11 charakteryzowało się owalnym kształtem blaszki liściowej, siedem – lirowato wciętym, ponadto wyróżniono jeszcze takie kształty jak: szerokolancetowaty, elipsowaty, liropodobny. Dominującą barwą liści była zielona (9 obiektów), osiem obiektów posiadało jasnozieloną barwę liści, a ciemnozieloną charakteryzowały się trzy genotypy, wyróżniono również barwę sinozieloną, szarozieloną oraz zieloną z antocjanem na nerwach i blaszce liściowej. Siedemnaście obiektów posiadało liście z nalotem woskowym, o różnym zróżnicowaniu w jego intensywności, natomiast brak nalotu zaobserwowano u pozostałych ośmiu genotypów. Powierzchnia blaszki liściowej u większości obiektów była pomarszczona i słabo pomarszczona, u pięciu obiektów gładka. Siedem form charakteryzowało się gładką krawędzią blaszki, pozostałe były faliste, drapowane lub zatokowo wcięte.

Po przeprowadzonej ocenie porażenia roślin przez patogeny w bieżącym sezonie wegetacyjnym u jedenastu z badanych genotypów zauważono objawy porażenia charakterystyczne dla czerni krzyżowych (*Alternaria brassicae*). U jednego genotypu wystąpiło porażenie przez mączniaka prawdziwego. Siedem obiektów wykazało niski poziom odporności na bakteryjne gnicie (*Erwinia spp./ Pseudomonas spp.*). jeden obiekt wykazał wrażliwość na czarną zgniliznę (*Xantomonas campestris*). W bieżącym sezonie wegetacyjnym nie zaobserwowano porażenia przez *Plasmodiophora brassicae*. Dwanaście genotypów uznano za wartościowe pod względem odporności, gdyż nie wystąpiły u nich objawy porażenia przez badane patogeny zostały rozmnożone wegetatywnie metodą sadzonek odrostowych.

Oceniana populacja była silnie zróżnicowana zarówno pod względem cech anatomiczno-morfologicznych, użytkowych, zdrowotności i wyrównania. W wyniku prowadzonych badań otrzymano bogatą i zróżnicowaną kolekcję genotypów, która może zostać wykorzystana do tworzenia nowych form użytkowych.