

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

Rozprawy  
nr 55

LUCYNA DROZDOWSKA

GLUKOZYNOLANY I ICH METABOLIZM U RZEPAKU  
W KULTURACH *IN VITRO* I *IN VIVO*

BYDGOSZCZ – 1992

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

Rozprawy  
nr 55

LUCYNA DROZDOWSKA

GLUKOZYNOLANY I ICH METABOLIZM U RZEPAKU  
W KULTURACH *IN VITRO* I *IN VIVO*

Biblioteka Główna ATR w Bydgoszczy



000000008297

BYDGOSZCZ – 1992

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO

prof. dr hab. Ojcumiła Stefaniak

OPINIODAWCY

prof. dr hab. Jan Krzymański

prof. dr hab. Maciej Zenktelek

REDAKTOR NAUKOWY

prof. dr hab. Janina Rogozińska

OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE

mgr Aleksandra Ławniczak, Zbigniew Gackowski



Wydano za zgodą Rektora  
Akademii Techniczno-Rolniczej  
w Bydgoszczy

ISSN 0209-0597

WYDAWNICTWO UCZELNIANE AKADEMII TECHNICZNO-ROLNICZEJ  
W BYDGOSZCZY

---

Wyd. I. Nakład 150 egz. Ark. aut. 5,1, ark. druk. 4,5. Papier druk. kl. III.  
Oddano do druku 8 września 1992 r. Druk ukończono we wrześniu 1992 r.  
MEN

Prasowe Zakłady Graficzne, Bydgoszcz, ul. Dworcowa 13.

Zamówienie nr 2176/92

## Spis treści

	str.
WYKAZ SYMBOLI I SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY .....	5
1. WSTĘP I CEL PRACY .....	6
2. PRZEGLĄD LITERATURY .....	8
3. MATERIAŁ I METODY .....	14
3.1. Materiał roślinny .....	14
3.2. Kultury in vitro izolowanych organów rzepaku (liścienie, wierzchołki pędów siewek, łuszczyny) .....	14
3.3. Analizy biochemiczne i cytologiczne .....	15
3.3.1. Oznaczanie aktywności myrozynazy .....	15
3.3.2. Mikroskopia świetlna i elektronowa .....	15
3.3.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa .....	16
4. WYNIKI .....	17
4.1. In vitro - kultury tkankowe .....	17
4.1.1. Morfogeneza izolowanych organów rzepaku (liścienie, wierzchołki pędów siewek, łuszczyny) .....	17
4.1.2. Aktywność myrozynazy i występowanie komórek myrozyna- zowych w kulturach liścieni i wierzchołków pędów ...	25
4.1.3. Glukozynolany, aktywność myrozynazy i występowanie komórek myrozynazowych w kulturach łuszczyn .....	29
4.2. In vivo - rośliny rzepaku uprawiane w polu .....	35
4.2.1. Kształtowanie się poziomu glukozynolanów i aktywności myrozynazy oraz występowanie komórek myrozynazowych w łuszczynach .....	35
5. Dyskusja .....	51
6. Wnioski .....	58
LITERATURA .....	59
STRESZCZENIA .....	68

## WYKAZ SYMBOLI I SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- „O” - odmiana o obniżonym poziomie kwasu erukowego w nasionach  
„OO” - odmiana o obniżonym poziomie kwasu erukowego i glukozynolanów w nasionach  
GLS - glukozynolany  
PRO - progoitryna  
GNA - glukonapina  
GBN - glukobrassikanapina  
IAA - kwas indolilo-3-octowy  
NAA - kwas naftylo-1-octowy  
BAP - 6-benzyloaminopuryna  
K - kinetyna  
GA<sub>3</sub> - kwas giberelinowy  
ABA - kwas abscysynowy  
MS - pożywka Murashige i Skoog'a  
CMS - cytoplazmatyczna męska sterylność  
PAPS - adenozylo-3-fosforylo-5-fosforylosiarczan  
NRU - najmniejsza różnica udowodniona

W części dotyczącej kultur in vitro stosowano słownictwo zgodnie z: Zenk-  
teler M.: Hodowla komórek i tkanek roślinnych. Praca zbiorowa. PWN, War-  
szawa 1984

## 1. WSTĘP I CEL PRACY

Jakość użytkową nasion rzepaku określa skład kwasów tłuszczowych w oleju i zawartość glukozyolanów w poekstrakcyjnej śrucie [54, 68]. Intensywne prace hodowlane prowadzone nad rzepakami mają na celu nie tylko uzyskanie odmian wysokoplennych, zimotrwałych, odpornych na choroby i wyleganie, ale także zmierzają do poprawienia jakości nasion. Ulepszone odmiany określa się jako jednozerowe (pozbawione kwasu erukowego w oleju) i dwuzerowe (bezerukowe i o niskiej zawartości glukozyolanów w śrucie).

Kanada jest pierwszym krajem, w którym uzyskano odmiany *Brassica napus* i *Brassica campestris* o obniżonej zawartości kwasu erukowego i glukozyolanów. Dla odmian zawierających mniej niż 2 % kwasu erukowego w oleju i mniej niż 30  $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$  glukozyolanów alkenylowych w śrucie, zaproponowana została (przez „Canola Council of Canada”) nazwa CANOLA [21].

Obecnie większość krajów uprawiających rzepak dysponuje podwójnie ulepszonymi odmianami, zastępując nimi odmiany tradycyjne. W krajach Wspólnoty Europejskiej, począwszy od roku 1992, finansowane będą wyłącznie te uprawy rzepaku, w nasionach którego poziom glukozyolanów nie przekroczy 20  $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$  [106].

Również Polska posiada własne, ulepszone odmiany rzepaku. Prawie 30-letni okres prac hodowlanych, prowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. J. Krzymańskiego, doprowadził do uzyskania genotypów rzepaku o obniżonym poziomie kwasu erukowego, jak i glukozyolanów. Pierwszą polską ulepszoną odmianą była odmiana Wipol, o obniżonej do około 10 % zawartości kwasu erukowego i zmniejszonej o około 30 % zawartości glukozyolanów [39]. Kolejne odmiany to Janpol, Beryl (odmiany bezerukowe) i Start (podwójnie ulepszona) [39, 69]. Spośród najnowszych podwójnie ulepszonych odmian (Jan-tar, Bolko, MAR), odmiana Bolko cechuje się bardzo niską zawartością glukozyolanów - poniżej 4  $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$  (suchej, odtłuszczonej śruty) [95]. Długotrwała selekcja poprawiająca cechy użytkowe rzepaku, wzbogacona o wkrzyżowanie plennych odmian jednozerowych, wyeliminowała takie ujemne cechy odmian ozimych, jak: brak odporności na niską temperaturę, małą plenność i niekorzystny pokrój rośliny [39, 70, 95].

Dla uzyskania nowej zmienności genetycznej stosuje się nie tylko tradycyjne metody hodowlane ale również nowoczesne metody biotechnologii, a w szczególności kultury *in vitro* protoplastów, komórek, tkanek i organów. Otrzymana tą drogą zmienność somaklonalna, jak i mieszańce rzepaku mogą być następnie wykorzystane w selekcji linii o wyższej plenności oraz jakości nasion. Metoda kultur *in vitro* umożliwiła ponadto klonalne rozmnażanie wartościowych linii rzepaku oraz pozwala na znaczne skrócenie czasu potrzebnego dla uzyskania pożądaných genotypów.

Duży potencjał morfogenetyczny rzepaku sprawia, iż metoda kultur *in vitro* może być wykorzystana do badań nad metabolizmem glukozyolanów [100,

102], poznanie którego jest przydatne w pracach nad doskonaleniem jakości nasion. Przy zastosowaniu metody kultur in vitro zostają wykluczone wzajemne powiązania między procesami metabolicznymi zachodzącymi w poszczególnych organach.

Główne założenia niniejszej pracy to:

- analiza czynników wpływających na metabolizm glukozyolanów,
- określenie korelacji między glukozyolanami a rozkładającym je enzymem,
- wykazanie przydatności metody kultur in vitro w badaniach nad glukozyolanami rzepaku.

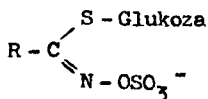
## 2. PRZEGLĄD LITERATURY

Glukozynolany, związki zawierające siarkę, są wtórnymi produktami przemiany materii u roślin. Metabolity wtórne wywodzą się z substancji pierwotnych i powstają na drodze szlaków biosyntetycznych, niezależnych od metabolizmu podstawowego. Synteza tego typu związków w roślinie jest warunkowana czynnikami genetycznymi i z tego względu ich występowanie ograniczone jest do określonych grup taksonomicznych roślin [77].

Obecność glukozynolanów stwierdzono u 15 rodzin należących do klasy dwuliściennych (Akaniaceae, Bataceae, Brassicaceae, Bretschneideraceae, Capparaceae, Caricaceae, Euphorbiaceae, Gyrostemonaceae, Limnanthaceae, Moringaceae, Pentadiplandraceae, Resedaceae, Salvadoraceae, Tropaeolaceae, Tovariaceae) [105]. U roślin z rodziny Brassicaceae wykryto ponad 100 glukozynolanów, przy czym u rodzaju *Brassica* 12-16 [111]. Skład jakościowy i ilościowy glukozynolanów zależy od gatunku, organu i stadium rozwojowego rośliny. W największych ilościach glukozynolany występują w nasionach, młodych siewkach i pierwotnych tkankach merystematycznych [71, 79]. Ich zawartość w nasionach może przekraczać 5 % powietrznie suchej masy, natomiast w częściach zielonych jest niższa niż 0,1 % [103].

W nasionach rzepaku, w największych ilościach występują cztery glukozynolany alkenylowe: 2-hydrokso-3-butenylowy (progoitryna) - 65 %, 3-butenylowy (glukonapina) - 25 %, 4-pentenylowy (glukobrassikanapina) - 8 %, 2-hydrokso-4-pentenylowy (napoleiferyna) - 2 %, a spośród glukozynolanów indolowych 4-hydrokso-4-glukobrassicyna (4 %) i glukobrassicyna (1 %) [105]. Nasiona tradycyjnych odmian rzepaku uprawianego w Polsce zawierały, w przeliczeniu na suchą i odtłuszczoną śrutę, przeciętnie 77  $\mu$ mola progoitryny, 35  $\mu$ mola glukonapiny i 8  $\mu$ mola glukobrassikanapiny [14].

Rysunek 1 przedstawia ogólny wzór glukozynolanów. Różnice strukturalne pomiędzy glukozynolanami związane są z resztą aglikonową - R [54, 57, 105].



Rys.1. Wzór strukturalny glukozynolanów

Fig.1. Structures of glucosinolates

Glukozynolany są syntezowane w czasie ontogenezy rzepaku w tkankach wegetatywnych oraz kuszczynach [7, 23, 54, 105] i podczas embriogenezy nagromadzają się w nasionach. Większość glukozynolanów obecnych w nasionach zlokalizowana jest w zarodkach dojrzałych nasion [36, 54]. Akumulacja glukozynolanów *in situ* rozpoczyna się około 16 dnia po zapłodnieniu, po czym gwałtownie wzrasta. Wzrostowi poziomu glukozynolanów w dojrzewających nasionach towarzyszy spadek zawartości tych związków w tkankach kuszczyn.



Ponieważ jednak spadek ten jest znacznie mniejszy niż wzrost poziomu w nasionach, sugeruje się iż glukozynolany lub ich prekursorzy muszą być transportowane do nasion również z innych części rośliny lub też zachodzi niezależna synteza w nasionach [23]. Tendencje te są podobne zarówno u odmian nisko- jak i wysokoglukozynolanowych.

Zawartość glukozynolanów w nasionach determinowana jest przez genotyp rośliny matcznej [68]. Obniżony poziom w liniach niskoglukozynolanowych nie jest wynikiem ograniczonego transportu glukozynolanów, lecz prawdopodobnie zmniejszoną ich synteza, spowodowaną genetyczną blokadą szlaku biosyntetycznego [55].

U tradycyjnych odmian rzepaku ilościowo przeważają glukozynolany alkenylowe, które w dojrzałych nasionach akumulowane są w ilości około 150  $\mu\text{moli}$  na gram śrutu. Znaczne obniżenie poziomu glukozynolanów alkenylowych, będące wynikiem intensywnych prac hodowlanych, wpłynęło na zmianę stosunku glukozynolanów indolowych do całkowitej ilości tych związków. W formach rzepaku podwójnie ulepszonych, glukozynolany indolowe mogą przekraczać 50 %, przy bezwzględnej ich zawartości 5 - 10  $\mu\text{moli} \cdot \text{g}^{-1}$  [54, 67].

Prekursorami glukozynolanów są niektóre aminokwasy. Endogenne glukozynolany alkenylowe, powszechnie występujące u rzepaku, syntezowane są z metioniny, natomiast prekursorem glukozynolanów indolowych jest tryptofan. Struktura łańcucha bocznego R innych poznanych glukozynolanów wskazuje, iż są one pochodnymi aminokwasów białkowych (alanina, walina, leucyna, tyrozyna) oraz niebiałkowych (np. kwas 2-amino-4-fenylomasłowy) [71]. Zaproponowany schemat biosyntezy glukozynolanów uwzględnia w łańcuchu przemian takie związki pośrednie jak aldoksyminy, kwasy tiorhydroksymowe i desulfoglukozynolany [50, 71]. Procesy prowadzące do powstania związków pośrednich, jak też szczegółowa biosynteza glukozynolanów nie są dokładnie poznane, między innymi ze względu na niską specyficzność enzymów uczestniczących w kolejnych etapach biosyntezy [7, 71]. Jednak ostatnio wykazano, iż końcowy etap przemian, a więc przekształcenie desulfoglukozynolanów do glukozynolanów, katalizuje enzym sulfotransferaza łącznie z PAPS'em, który jest donorem siarki [37].

Lokalizacja glukozynolanów w komórce nie została dotychczas dokładnie określona. Przypuszcza się, że są one gromadzone w wakuolach [40, 127].

Glukozynolany są substancjami nietoksycznymi, jednak produkty ich enzymatycznego rozkładu wpływają ujemnie na wzrost i reprodukcję zwierząt skarmianych poekstrakcyjną śrutą odmian tradycyjnych. I tak np. winyloksazolinydion, produkt hydrolizy progoitryny, powoduje powiększenie tarczycy, natomiast nityle, produkty hydrolizy glukozynolanów w środowisku kwaśnym, ujemnie wpływają na funkcjonowanie wątroby [17, 71]. Z kolei niektóre izotiocyjaniiny (aromatyczne) oraz glukozynolany indolowe działają antyrakowo [111].

Funkcje fizjologiczne glukozynolanów w roślinie są słabo poznane. Pewnych danych dostarczają prace, w których próbowano znaleźć korelacje między toksycznymi właściwościami produktów hydrolizy glukozynolanów a oddziaływaniem roślin zawierających te związki na owady, patogeny grzybowe

i wirusy [17]. Między innymi wykazano, że nagromadzenie glukobrassicyny w liściach krzyżowych jest podwyższone u roślin zaatakowanych przez owada *Psylliodes chrysocephala* [65]. Znane jest również negatywne oddziaływanie izotiocyanianów allilowego i butenylowego na wzrost bakterii i grzybów [17, 33]. Odmiany wysokoglukozynolanowe rzepaku są w mniejszym stopniu atakowane przez dzikie zwierzęta, co wskazuje na obronną rolę tych związków [105].

Glukozynolany uczestniczą również w zjawiskach allelopatii, ponieważ produkty ich hydrolizy przedostające się do gleby mogą oddziaływać na inne rośliny. [18]. Stwierdzono hamowanie kiełkowania nasion i znaczną redukcję systemu korzeniowego rzepaku na terenach, gdzie był uprawiany w 3-letnim płodozmianie w porównaniu z 5-letnim. Ten hamujący wpływ przypisuje się produktom rozkładu glukozynolanów indolowych, które pozostają w związku z syntezą IAA [78, 105]. Również glukozynolan 3-indolilometylowy może być przekształcony w roślinie do auksyny, 3-indolilonitrylu i kwasu 3-indoliloctowego [71]. Rola glukozynolanów w metabolizmie roślin związana jest także z tym, iż są one źródłem siarki. Odmiany podwójnie ulepszone reagują na deficyt siarki w podłożu gwałtowniej niż odmiany tradycyjne [106]. Dlatego też znaczna redukcja zawartości glukozynolanów może mieć ujemny wpływ na wigor nowych odmian i odporność na infekcje [105].

Występowanie glukozynolanów w roślinach związane jest z obecnością enzymu - myrozynazy ( $\beta$ -tioglukozydaza, glukohydrolaza tioglukozydowa EC 3.2.3.1.). Katalizuje on hydrolizę glukozynolanów (w zależności od substratu i pH) do izotiocyanianów, nitryli lub tiocyanianów oraz glukozy i siarczanów. W wyniku hydrolizy głównych glukozynolanów rzepakowych: glukonapiny, glukobrassicnanapiny i progoitryny powstają odpowiednie izotiocyaniany: 3-butenylowy (ITC-B), 4-pentenylowy (ITC-P) i winylooksazolidyntion (WOT).

Myrozynaza występuje w idioblastach, wyspecjalizowanych komórkach zwanych komórkami myrozynazowymi. Termin komórki myrozynazowe został po raz pierwszy wprowadzony w roku 1890 przez Guinarda [9]. Ich występowanie szczególnie przebadano w liścieniach tworzącego się zarodka, w kiełkujących nasionach oraz łodygach i liściach gorczycy [97, 123, 124]. Obecność komórek myrozynazowych w zarodkach rzepaku oraz w organach siewek innych przedstawicieli Brassicaceae stwierdzili Tykarska [119], Iversen i in. [47] oraz Bones i Iversen [9]. Idioblasty myrozynazowe są rozmieszczone wśród komórek parenchymy; różnią się od nich wielkością, kształtem oraz zawierają specyficzne ciała białkowe zwane ziarnami myrozynowymi. Badania ultrastruktury tych komórek wykazały obecność błon szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów, diktiosomów, plastydów oraz jądra z jąderkami [9, 53]. Głównym składnikiem komórek myrozynazowych są ziarna myrozynowe, powstające według Werkera i Vaughan [124] z cystern retikulum endoplazmatycznego, które zawierają ten enzym. Natomiast Jorgensen [53] oraz Hoefert i Martin [42] uważają, iż wakuole ulegają przekształceniu w ziarna myrozynowe. Dokładnych danych na temat lokalizacji myrozynazy w komórkach myrozynazowych mogą dostarczyć badania immunohistochemiczne. Ostatnie

prace (z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał) sugerują, iż enzym ten połączony jest z membranami otaczającymi ziarna myrozynowe [116].

W organach, w których występują komórki myrozynazowe, istnieje ścisła korelacja między obecnością tych komórek a aktywnością enzymu. Analizy biochemiczne i cytologiczne (z zastosowaniem mikroskopu elektronowego) wykazały, iż aktywność enzymu nie zawsze jest związana z obecnością komórek myrozynazowych [47]. Występowanie komórek myrozynazowych zależy od czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Jednym z czynników endogennych, jak podają Bones i Iversen [9], jest gatunek rośliny. Spośród przebadanych siewek 7 gatunków roślin należących do Brassicaceae najliczniej komórki te występowały u gorczycy, a najmniej licznie u rzodkiewki. Również wiek organów jest ważnym czynnikiem wpływającym na liczbę komórek myrozynazowych, przy czym młode organa roślinne zawierają ich więcej niż starsze. Spośród czynników zewnętrznych duży wpływ na ich ilość ma światło. Większą liczbę komórek myrozynazowych zawierały korzenie i hypokotyle siewek rosnących na świetle [9].

W badaniach nad izolacją czystego enzymu i jego charakterystyką źródłem myrozynazy były nasiona gorczycy [91, 93] i rzepaku [58, 64, 74]. Pozwoliły one stwierdzić, iż w nasionach rzepaku znajdują się cztery formy izoenzymów myrozynazy. Udoskonalenie metod izolacji izoenzymów, poprzez zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych, umożliwiło nie tylko bardziej precyzyjne określenie właściwości fizykochemicznych myrozynazy, ale również szczegółową analizę jej składu aminokwasowego i węglowodanowego [10]. Izoenzymy myrozynazy są glikoproteinami o ciężarze cząsteczkowym 154 kDa i składają się z dwóch podjednostek polipeptydowych, każda o ciężarze 77 kDa. Wykazują one najwyższą aktywność w zakresie pH 5,2 - 5,5 i temperaturze 70 - 75 °C. Łańcuchy polipeptydowe izoenzymów są prawie identyczne, natomiast różnią się składem ilościowym węglowodanów (fruktoza, mannoza, glukozaamina) i punktem izoelektrycznym.

Celem lepszego poznania metabolizmu glukozynolanów rzepaku i układu enzymatycznego hydrolizującego te związki, zaczęto ostatnio stosować metodę kultur in vitro. Nieliczne prace z tego zakresu dotyczą występowania glukozynolanów w izolowanych zarodkach, liścieniach [100] i tkance kalusowej rzepaku [1, 100] oraz liścieniach [90] i kulturach komórkowych Brassica juncea [35]. Wykazały one, iż w izolowanych zarodkach rzepaku hodowanych in vitro, dominującym glukozynolanem, podobnie jak w nasionach, była progoitryna. W znacznie mniejszych ilościach występowały glukonapina i glukobrassikanapina. Poziom tych związków zależał od czynników środowiska i ulegał gwałtownemu obniżeniu w ciągu pierwszych czterech dni kultury [100]. Podobnie zachodził katabolizm glukozynolanów w liścieniach Brassica juncea [90]. Nie następował jednak całkowity rozpad i glukozynolany były obecne w starszych kulturach liścieni i zregenerowanych roślinach.

Szczegółowych danych dostarczają badania przeprowadzone przez Grootwassink i in. [41] z kulturami komórkowymi Brassica juncea. W badaniach tych do wykrywania glukozynolanów zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczą, która w przeciwieństwie do dotychczas stosowanych metod (chroma-

tografia gazowa produktów rozkładu glukozynolanów lub ich trójmetylosilolowych pochodnych) umożliwia oznaczenie wszystkich obecnych glukozynolanów. Dominującymi glukozynolanami w kulturach komórkowych *B. juncea* były glukozynolany indolowe. W kolejnych dniach kultury poziom ich ulegał obniżeniu, a modyfikacja pożywki zmieniała ich poziom tylko czasowo. W przeciwieństwie do kultur tkanek i organów, w kulturach komórkowych *B. juncea*, glukozynolany alifatyczne były niewykrywalne, nawet po dodaniu do pożywki ich prekursora - metioniny. Natomiast wprowadzenie do pożywki prekursora jednego z pośrednich etapów biosyntetycznego szlaku glukozynolanów (2-nitrobenzaldoksym) indukowało syntezę „sztucznego” glukozynolanu nitrofenolowego i innych metabolitów siarczanowych, które były wykorzystywane przez kultury w procesie wzrostu. Dotychczasowe wyniki badań wskazują więc, że w kulturach *in vitro* nie zachodzi synteza *de novo* endogennych glukozynolanów [41].

Badania nad myrozynazą w kulturach *in vitro* rzepaku podjęli Iversen i Baggerud [48] oraz Bones [8]. Są to jedyne doniesienia o aktywności enzymu w kulturach protoplastów oraz różnicującym się kalusie i organach. W analizowanym materiale autorzy stwierdzili obecność myrozynazy, przy czym jej aktywność była niższa w kulturach *in vitro* niż w materiale, z którego inicjowano kultury. Wzrost aktywności myrozynazy towarzyszył procesom różnicowania tkanki kalusowej. Wyższa aktywność enzymu w kalusie z wyróżnicowanymi pędami w porównaniu z kalusem nieróżnicującym się oraz fakt, iż enzym był wykrywalny w utrzymywanych w hodowli kulturach kalusa, pozwala więc sugerować, iż układ jest stabilny i może być syntezowany w kulturach *in vitro*.

Metoda kultur *in vitro* wykorzystana w hodowli rzepaku jako uzupełnienie metody konwencjonalnej, stwarza perspektywy uzyskania ulepszonych genotypów. Zasadniczym warunkiem pozwalającym na jej zastosowanie w praktyce jest określenie czynników sprzyjających intensywnej regeneracji roślin. U rzepaku, podobnie jak u innych roślin, proces ten zależy przede wszystkim od genotypu, rodzaju eksplantatu i składu pożywki, a zwłaszcza egzogennych regulatorów, które determinują indukcję pędów i korzeni [51]. Rolę czynnika genetycznego w procesie regeneracji u rodzaju *Brassica* analizowali Murata i Orton [84]. Spośród siedmiu przebadanych gatunków największymi zdolnościami do tworzenia pędów na eksplantatach liścieni charakteryzowały się gatunki zawierające genom C, a więc *Brassica napus* i *Brassica oleracea*. Pozwoliło to autorom na wysunięcie hipotezy, że geny odpowiedzialne za ten proces to geny zlokalizowane właśnie w tym genomie. Z kolei indukcja tkanki kalusowej związana była z genami genomu B, co wykazane zostało na przykładzie *Brassica nigra* i *Brassica juncea*. Ta genetyczna hipoteza nie wyklucza roli innych czynników, jak np. obniżonego poziomu sacharozy (indukcja pędów) czy interakcji gatunek x auksyna (tworzenie tkanki kalusowej).

Wyniki prac, celem których było określenie zdolności regeneracyjnych różnych eksplantatów rzepaku, wskazują na duży potencjał morfogenetyczny tej rośliny. Indukcję organogenezy uzyskano między innymi z liścieni i ko-

rzeni siewek [72, 99, 101], z wierzchołków pędów [16], fragmentów kłodyg [59, 113], liści [29], z eksplantatów epidermy i tkanek subepidermalnych [61]. Regeneracja roślin w kulturach *in vitro* rzepaku zachodzi poprzez powstawanie merystemów pędów, jak też poprzez tworzenie zarodków somatycznych (somatyczna embriogeneza). Przykłady somatycznej embriogenezy u tej rośliny dotyczą przede wszystkim kultur pylnikowych [86, 87, 110] oraz kultur protoplastów [66, 73].

Głównymi osiągnięciami biotechnologii u gatunków Brassica, w tym u rzepaku, są haploidydzacja poprzez kultury pylnikowe i kultury izolowanych mikrospor [19, 30, 86, 87, 117] oraz hodowla odpornościowa (herbicydy) z wykorzystaniem zawiesin komórek [104, 115]. Inne zagadnienia to kultury protoplastów i związana z tym somatyczna hybrydyzacja. Hypokotyle rzepaku są najlepszym i najczęściej stosowanym źródłem protoplastów, gdyż ich tkanki charakteryzują się aktywnym wzrostem, dużą zdolnością do regeneracji i stabilnością genetyczną [4, 114]. Niemniej, regenerację roślin rzepaku uzyskano również z protoplastów izolowanych z takich tkanek jak korzenie [126], liścienie [76] oraz liście [63].

Somatyczna hybrydyzacja poprzez fuzję protoplastów jest olbrzymim postępem w dziedzinie biotechnologii. Z chwilą gdy okazało się, że istnieje możliwość uzyskania roślin mieszańcowych w obrębie rodzaju Brassica oraz między Brassica napus a przedstawicielami innych gatunków i plemion należących do rodziny Brassicaceae, podjęto intensywne prace zmierzające do przeniesienia do rzepaku ważnych w programie hodowlanym cech odporności, tolerancji na suszę i niskie temperatury oraz cytoplazmatycznej męskiej sterility [38, 62, 114, 119]. Płodne mieszańce międzygatunkowe i międzyrodzajowe uzyskano poprzez fuzję protoplastów, co nie zawsze było możliwe w metodzie konwencjonalnej. Podjęto również próbę przeniesienia z gorczycy białej do rzepaku cechy odporności na *Alternaria* sp. i *Phoma lignam*. Ta i inne agronomicznie ważne cechy, będące wynikiem wprowadzenia do rzepaku obcych genów (CMS, tolerancja na suszę i niskie temperatury) są aktualnie testowane w uprawie polowej mieszańców somatycznych. Bada się również możliwość wstecznego krzyżowania mieszańców z rzepakiem, celem znalezienia odporności na inne patogeny i szkodniki [38, 94].

Dużą wydajność opracowanych metod, takich jak uzyskiwanie podwojonych haploidów [87], czy somatycznych mieszańców [38], umożliwia wykorzystanie w programie hodowlanym nowych form rzepaku. Metody te, jak i występująca niejednokrotnie w kulturach *in vitro* zmienność somaklonalna, przyczyniają się do poszerzenia puli genetycznej tej ważnej rolniczo rośliny.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał roślinny

Materiał do doświadczeń stanowiły trzy odmiany rzepaku ozimego *Brassica napus* L. spp. oleifera, o różnej zawartości glukozynolanów i kwasu erukowego w nasionach:

- Jet Neuf - odmiana francuska, wysokoglukozynolanowa, o obniżonym poziomie kwasu erukowego w nasionach, „0”;
- Jantar - odmiana polska, podwójnie ulepszona, „00” (obniżony poziom glukozynolanów i kwasu erukowego), wpisana do Rejestru Odmian w 1985 r. [39];
- Bolko - odmiana polska, podwójnie ulepszona, „00”, uzyskana w wyniku dwustronnego przekrzyżowania czterech rodów dwuzerowych rzepaku z odmianą Jet Neuf, przyjęta do Rejestru Odmian w 1989 r. [95].

Nasiona badanych odmian uzyskano z Zakładów Doświadczalnych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Małyszynie i Borowie. Rośliny rzepaku, z których pobierano łuszczyzny, rosły na polstkach Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Chrząstowie.

#### 3.2. Kultury in vitro izolowanych organów rzepaku

##### A. Kultury liścieni

Nasiona rzepaku sterylizowano powierzchniowo w 0,2 %  $\text{HgCl}_2$  z dodatkiem Tween'u 20 przez 15 minut, następnie płukano w sterylnej wodzie i wykładano na rozcieńczoną (1:1) mineralną pożywkę Murashige i Skoog'a [83] zastaloną agarem (0,8 %). Po trzech dniach z kiełkujących nasion izolowano liścienie, cięto na połowę i wykładano na pożywkę MS z  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (=  $10 \text{ } \mu\text{M}$  NAA +  $10 \text{ } \mu\text{M}$  BAP [99]).

##### B. Kultury wierzchołków pędów siewek

Z pięciodniowych, sterylnych siewek rzepaku izolowano 0,5 cm wierzchołki pędów. Umieszczano je na pożywce MS z regulatorami wzrostu:  $1,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP,  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP lub na pożywce bez regulatorów wzrostu (kontrola).

##### C. Kultury izolowanych łuszczyzn

Łuszczyzny izolowano z roślin rosnących w warunkach polowych (maj - lipiec 1989, 1990). Po 15 minutach sterylizacji w 0,2 %  $\text{HgCl}_2$  z dodatkiem

Tween'u 20 i kilkakrotnym płukaniu w sterylnej wodzie inkubowano je na pożywkę MS z witaminami według Gamborga [28].

Badanym czynnikiem endogennym była faza rozwojowa izolowanej łuszczyzny:

- a) faza I - około 6 dnia po zapłodnieniu, zarodek w stadium kulistym,
- b) faza II - około 8 dnia po zapłodnieniu, zarodek w stadium sercowatym (początkowe),
- c) faza III - około 10 dnia po zapłodnieniu, zarodek w stadium sercowatym (starsze).

Z czynników egzogennych przebadano wpływ zestalenia pożywki (0; 0,5 %; 0,8 % agaru) oraz rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu (tab. 3).

Kultury liścieni, wierzchołków pędów siewek oraz izolowanych łuszczyzn rzepaku rosły w warunkach 16 h fotoperiodu (16 h światło/8 h ciemność), przy natężeniu światła około 3000 lx ( $34,9 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sek}^{-1}$ ), w temperaturze  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Po 4-6 tygodniach wzrostu określano ich potencjał morfogenetyczny.

### 3.3. Analizy biochemiczne i cytologiczne

#### 3.3.1. Oznaczanie aktywności myrozynazy

Aktywność myrozynazy oznaczano metodą opisaną przez Iversena i in. [47]. Świeżą masę (1 g) homogenizowano w buforze imidazolowym (0,01 M) o pH 6,2. Homogenat wirowano przez 15 minut przy 10 000 xg w temperaturze  $+4^\circ\text{C}$ . Następnie supernatant dializowano przez 24 h w tym samym buforze. Do oznaczeń pobierano 0,5 ml supernatantu (enzym), dodawano 0,5 ml sinigriny (glukozynolan 2-propenylowy - substrat) i 1 ml buforu cytrynianowego o pH 5,5. Mieszaninę inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 20 minut, po czym reakcję hamowano przez umieszczenie prób na okres 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. W wyniku hydrolizy sinigriny uwolniona zostaje glukoza, która tworzy barwny kompleks ze specyficznym odczynnikiem GOD-Perid (bufor fosforanowy, peroksydaza, oksydaza glukozy). Po dodaniu 5 ml tego odczynnika do mieszaniny reakcyjnej i inkubacji w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 15 minut, mierzono absorbancję przy 420 nm wobec próby odczynnikowej (bufor imidazolowy, sinigrina, bufor cytrynianowy, GOD-Perid). Ilość uwolnionej glukozy odczytywano z krzywej wzorcowej. Aktywność specyficzną wyrażano w mikromolach uwolnionej glukozy / min / mg białka. Białko oznaczano metodą Lowry i in. [75], stosując jako wzorzec albuminę wołową.

#### 3.3.2. Mikroskopia świetlna i elektronowa

Do badań anatomicznych, celem których było stwierdzenie zmian zachodzących w hodowanych in vitro łuszczyznach, materiał utrwalano w FAA (formalina - etanol - kwas octowy). Utrwalone łuszczyzny cięto na jednocentymetrowe odcinki, odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu i zataplano w parafinie. Skrawki mikrotomowe o grubości 14  $\mu\text{m}$  po odparafinowaniu

i uwodnieniu barwiono hematoksyliną według Heidenheina [28].

Celem stwierdzenia występowania komórek myrozynazowych oraz ich rozmieszczenia w analizowanym materiale, 1-2 mm fragmenty tkanek utrwalano w 2,5 % aldehydzie glutarowym w buforze kakodylanowym (pH 7,2) przez 24 h. Po trzykrotnym płukaniu tkanek w buforze (kakodylanowy), ponownie je utrwalano w czterotlenku osmu (2 % OsO<sub>4</sub> w buforze kakodylanowym). Po odwodnieniu materiału we wzrastających stężeniach alkoholu zatapiano tkanki w żywicy eponowej [81]. Proces polimeryzacji przeprowadzano w temperaturze 60 °C przez 48 h.

Półciénkie skrawki do mikroskopii świetlnej cięto na ultramikrotomie (LKB Ultratome IV). Przenoszono je następnie na szkiełka przedmiotowe i podgrzewano do temperatury 70 °C podczas barwienia 1 % błękitem toluidynowym. Obecność komórek myrozynazowych sprawdzano w mikroskopie z kontrastem fazowym.

Ultracienkie skrawki do mikroskopii elektronowej kontrastowano przez 15 minut w 1 % octanie uranylu, a następnie w cytrynianie ołowiu. Ultrastrukturę komórek myrozynazowych analizowano w mikroskopie elektronowym JEOL 100 B.

Obecność komórek myrozynazowych analizowano również metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem specyficznych przeciwciał na myrozynazę. Kompleks myrozynaza - przeciwciało znakowano barwnikiem fluorescencyjnym lub peroksydazą [116]. Badania te, jak również związane z mikroskopią elektronową, zostały wykonane w Laboratorium prof. Iversena w Instytucie Botaniki Uniwersytetu w Trondheim (Norwegia).

### 3.3.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Materiał roślinny, pochodzący z kultur in vitro lub łuszczyzny, bezpośrednio po przewiezieniu z pola zamrażano w ciekłym azocie, a następnie liofilizowano. Próbkki o masie 0,1 - 0,5 g ekstrahowano wrzącym 70 % metanolem ze standardem wewnętrznym (glukobarbaryna). Następnie na mikrokolumny z DEAE-Sephadexem наносzono 1 ml ekstraktu, przemywano wodą, buforem octanowym (0,01 M, pH 5,0) i dodawano roztwór sulfatazy. Po około 16 h inkubacji, desulfoglukozynolany wmywano z kolumny wodą i poddawano wysokosprawnej chromatografii cieczowej [7, 56] \*.

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji i wyliczono NUR, a następnie określono korelacje liniowe poszczególnych czynników.

\* Analizy wykonano w Instytucie Genetyki PAN w Poznaniu.



#### 4. WYNIKI

##### 4.1. In vitro - kultury tkankowe

##### 4.1.1. Morfogeneza izolowanych organów rzepaku (liścienie, wierzchołki pędów siewek, łuszczyzny)

Liścienie izolowane z kiełkujących nasion i umieszczone na pożywce MS z regulatorami wzrostu ulegały zazielenieniu i powiększeniu, a następnie tworzyły korzenie (po 1-2 tygodniach), tkankę kalusową (po około 2 tygodniach) i pędy (po około 3 tygodniach), (tab. 1 oraz rys. 2).

Tabela 1  
Table 1

Potencjał morfogenetyczny liścieni rzepaku inkubowanych na pożywce MS z  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (okres inkubacji - 4 tygodnie)  
Morphogenetic potential of oilseed rape cotyledons growing on MS medium with  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (incubation period - 4 weeks)

Odmiana Cultivar	Różnicowanie liścieni (%) * Differentiation of cotyledons (%) *		
	kalus callus	kalus + korzenie callus + roots	pędy shoots
Jet Neuf	75	53	26
Bolko	60	50	15
Jantar	60	43	13

\* każda odmiana obejmowała 24 liścienie

\* each cultivar was represented by 24 cotyledons



Jet Neuf

Bolko

Jantar

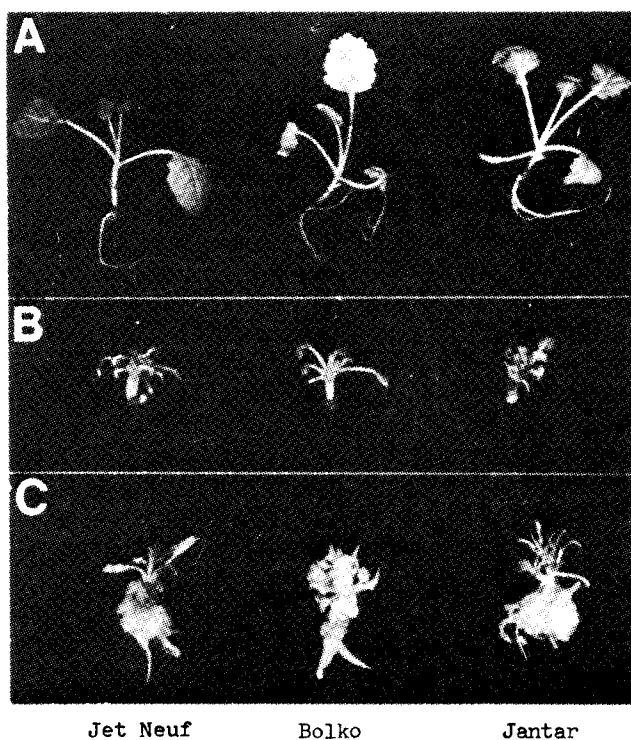
Rys.2. Wpływ regulatorów wzrostu ( $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP) na różnicowanie liścieni badanych odmian rzepaku w kulturach in vitro (okres inkubacji - 4 tygodnie)

Fig.2. The effect of growth regulators ( $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP) on differentiation of cotyledons of investigated oilseed rape cultivars in in vitro culture (incubation period - 4 weeks)

Kalus tworzył się przede wszystkim w miejscach przecięcia liścieni. Obfity, biało-żółty kalus miał zdolność do ryzogenezy, natomiast zbity, o barwie zielonej, posiadał właściwości pączkotwórcze. Niekiedy obserwowano organogenezę bezpośrednią, bez stadium kalusa, przy czym pędy wyrastały w miejscu, w którym odcinano ogonek liścienia.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 1, badane odmiany różniły się zdolnościami morfogenetycznymi. Proces regeneracji zachodził intensywniej na liścieniach odmiany Jet Neuf niż na liścieniach odmian podwójnie ulepszonych. Natomiast zdolność do organogenezy odmian Jantar i Bolko była zbliżona.

Rozwój izolowanych wierzchołków pędów pięciodniowych siewek zależał od obecności regulatorów wzrostu.



Rys.3. Wpływ regulatorów wzrostu na różnicowanie wierzchołków pędów siewek badanych odmian rzepaku w kulturach in vitro: A - 0 regulatorów wzrostu, B -  $1,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, C -  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (okres inkubacji - 4 tygodnie)

Fig.3. The effect of growth regulators on differentiation of seedling shoot tips of investigated oilseed rape cultivars in in vitro culture: A - 0 growth regulators, B -  $1,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, C -  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (incubation period - 4 weeks)

Z wierzchołków inkubowanych na pożywce kontrolnej (bez regulatorów wzrostu) rozwijały się pojedyncze, ukorzenione roślinki (rys. 3A). Dodanie do pożywki BAP ( $1,12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) indukowało rozwój pąków bocznych, z których rozwijały się liczne pędy (rys. 3B). Zastosowanie kombinacji NAA + BAP stymulowało ponadto indukcję tkanki kalusowej, z której tworzyły się korzenie (rys. 3C). Zdolności morfogenetyczne eksplantatów trzech badanych odmian były zbliżone. Indukcja tkanki kalusowej oraz organogeneza zachodziła na 90 - 100 % wierzchołków pędów siewek (tab. 2).

Tabela 2  
Table 2

Wpływ regulatorów wzrostu na różnicowanie wierzchołków pędów siewek rzepaku (okres inkubacji - 4 tygodnie)  
The effect of growth regulators on differentiation of oilseed rape shoot tips of seedlings (incubation period - 4 weeks)

Stężenie regulatorów wzrostu ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) <sup>*</sup> Growth regulators concentration ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) <sup>*</sup>	Różnicowanie wierzchołków (%) Differentiation of shoot tips (%)		
	Odmiana Cultivar		
	Jet Neuf	Bolko	Jantar
0	90	95	95
1,12 BAP	100	100	95
1,86 NAA + 2,25 BAP	100	95	100

\* każda kombinacja obejmowała 24 wierzchołki pędów

\* each combination was represented by 24 shoot tips

Kolejnym etapem badań było określenie czynników wpływających na morfogenezę izolowanych łuszczyń rzepaku. W doświadczeniach wstępnych wykazano, iż wzrost i rozwój łuszczyń różnych odmian zachodzi w kulturach *in vitro* podobnie i zależy między innymi od fazy rozwojowej izolowanej łuszczyzny [26]. Z tego względu szczegółową analizę wzrostu przeprowadzono na izolowanych łuszczyznach odmiany Jet Neuf, natomiast do badań nad wpływem czynników endogennych na dojrzewanie nasion wykorzystano łuszczyzny izolowane w różnych fazach rozwojowych.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 3, na wzrost elongacyjny łuszczyń miały wpływ badane czynniki zewnętrzne, jak stopień zestalenia pożywki i regulatory wzrostu. Najmniejsze przyrosty długości stwierdzono w łuszczyznach hodowanych na pożywce pozbawionej regulatorów. Wynosiły one (bez względu na stopień jej zestalenia) 0,47 - 0,58 cm.

Wykazano współdziałanie regulatorów wzrostu ze stopniem zestalenia pożywki w stymulacji przyrostów na długość izolowanych łuszczyń, które wynosiły średnio 1,0 cm (pożywka płynna), 1,08 cm (0,5 % agaru) i 1,43 cm (0,8 % agaru). Optymalną pożywką dla elongacji łuszczyń okazała się pożyw-

ka zestalona (0,8 % agaru) i zawierająca kombinację  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, na której przyrosty długości wynosiły ponad 2,0 cm (tabela 3).

Tabela 3  
Table 3

Wpływ regulatorów wzrostu i stężenia agaru w pożywce na przyrosty długości łuszczyń oraz % łuszczyń, w których dojrzewały nasiona (III faza rozwojowa, okres inkubacji - 4 tygodnie)

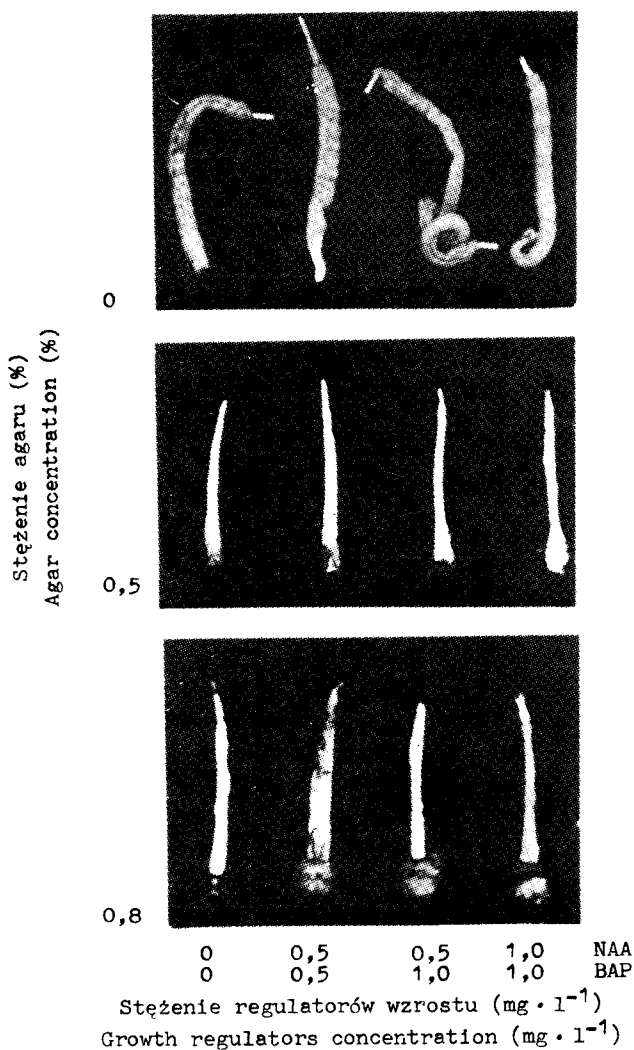
The effect of growth regulators and agar concentration in the medium on siliques elongation and % of siliques with ripe seeds (III stage of development, incubation period - 4 weeks)

Stężenie regulatorów wzrostu $(\text{mg} \cdot \text{l}^{-1})^*$ Growth regulators concentration $(\text{mg} \cdot \text{l}^{-1})^*$	Przyrosty długości (cm) Increase in length (cm)				% łuszczyń z dojrzalymi nasionami % of siliques with ripe seeds		
	Stężenie agaru (%) Agar concentration (%)						
	0	0,5	0,8	$\bar{x}$	0	0,5	0,8
0	0,54	0,47	0,58	0,53	33,3	50,0	30,7
0,5 NAA	1,05	1,37	1,20	1,21	38,3	38,3	42,2
1,0 NAA	0,85	1,01	1,30	1,05	50,0	33,3	68,3
0,5 BAP	1,80	0,81	1,25	1,29	56,6	41,6	58,3
1,0 BAP	1,44	1,55	1,70	1,56	45,0	20,0	68,8
0,5 NAA + 0,5 BAP	0,65	1,08	1,55	1,09	45,0	33,3	72,3
0,5 NAA + 1,0 BAP	0,65	0,83	1,65	1,04	25,0	33,3	45,0
1,0 NAA + 0,5 BAP	0,85	1,25	1,60	1,23	16,6	10,0	90,0
1,0 NAA + 1,0 BAP	1,25	1,35	2,05	1,55	66,6	80,0	85,0
$\bar{x}$	1,00	1,08	1,43				
NUR <sub>0,05</sub> dla: LSD <sub>0,05</sub> for: - stężenia agaru (I) 0,155 agar concentration - regulatorów wzrostu (II) 0,268 growth regulators - interakcji (I x II) 0,465 interaction							

\* każda kombinacja obejmowała 20 łuszczyń

\* each combination was represented by 20 siliques

W porównaniu z łuszczykami rozwijającymi się na roślinach, u których długość i szerokość wzrastają proporcjonalnie, łuszczyki hodowane in vitro przyrastały znacznie na grubość. Proces ten był szczególnie widoczny w łuszczykach inkubowanych na pożywce płynnej (rys. 4).

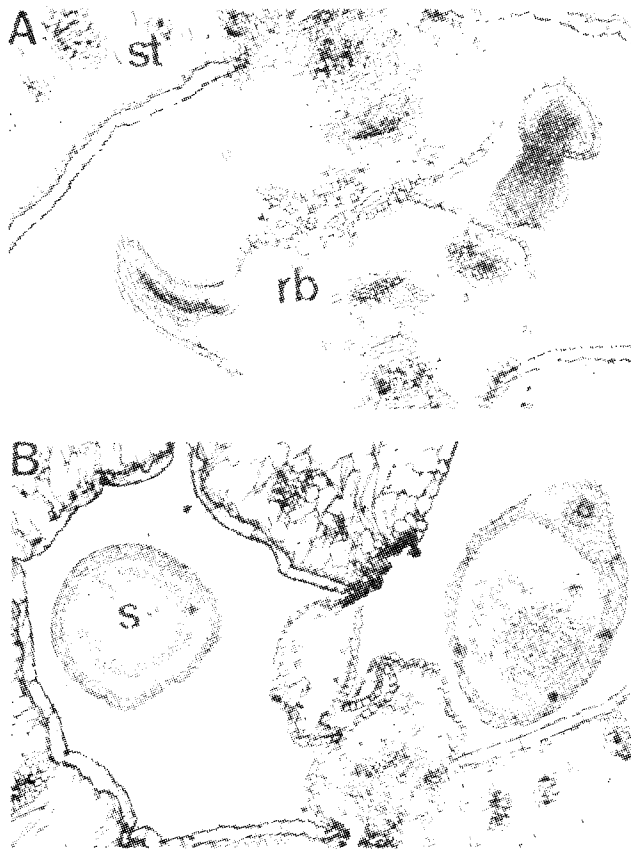


Rys.4. Wpływ regulatorów wzrostu i stężenia agaru na morfogenezę izolowanych łuszczyń rzepaku (odmiana Jet Neuf) w kulturach in vitro (okres inkubacji - 4 tygodnie)

Fig.4. The effect of growth regulators and agar concentration on the morphogenesis of isolated oilseed rape (cv. Jet Neuf) siliques in in vitro culture (incubation period - 4 weeks)

Jak wykazały badania anatomiczne, proces zwiększania grubości łuszczyń spowodowany był znacznym powiększeniem komórek w następstwie bezpośredniego kontaktu eksplantatów z pożywką (rys. 5 A).

Faza rozwojowa izolowanej łuszczyzny i związany z tym rozwój zarodka była bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na dojrzewanie nasion w łuszczyznach hodowanych in vitro. W łuszczyznach izolowanych w fazie II i III, a więc około 8 i 10 dnia po zapłodnieniu, dojrzewało więcej nasion niż w łuszczyznach izolowanych w fazie I, a więc młodszych (tab. 4).



Rys.5. Przekroje poprzeczne przez łuszczyzny rzepaku (odmiana Jet Neuf) rosące w kulturach in vitro: A - grubienie tkanek łuszczyzny (st) i fałszywej przegrody (rb), B - zamieranie nasion (s), (okres inkubacji - 4 tygodnie, pożywka płynna, 0 regulatorów wzrostu, x 500)

Fig.5. Cross section through oilseed rape siliques (cv. Jet Neuf) grown in vitro: A - thickening of silique tissue (st) and vascular bundle (rb), B - seed degeneration (s), (incubation period - 4 weeks, liquid medium, 0 growth regulators, x 500)

Badania mikroskopowe wykazały, iż w młodszych łuszczyznach większość formujących się nasion posiadała zarodki w stadium kulistym. Tę fazę rozwojową zarodka uznaje się za heterotroficzną. Również bielmo nie jest jeszcze w pełni wykształcone i z tego powodu zarodki te nie są zdolne do dalszego rozwoju na syntetycznej pożywce.

Z fazą rozwojową łuszczyzny współdziałał badany czynnik egzogenny - zastąpienie pożywki. Najwięcej zapłodnionych zalążków przekształcało się w nasiona w łuszczyznach, które były inkubowane na pożywce płynnej. Nie na wszystkich jednak tworzyła się twarda i ciemna okrywa nasienna. Osiągały one rozmiary zbliżone do nasion dojrzałych, pozostawały zielone, jednak po pewnym czasie niektóre z nich zamierały (rys. 5 B).

Tabela 4  
Table 4

Wpływ fazy rozwojowej izolowanej łuszczyzny, regulatorów wzrostu oraz stężenia agaru w pożywce na liczbę dojrzałych nasion w kulturach in vitro łuszczyzn rzepaku (okres inkubacji - 4 tygodnie)

The effect of developmental stage of isolated oilseed rape siliques, growth regulators and agar concentration in the medium on the number of ripe seeds in oilseed rape siliques grown in vitro (incubation period - 4 weeks)

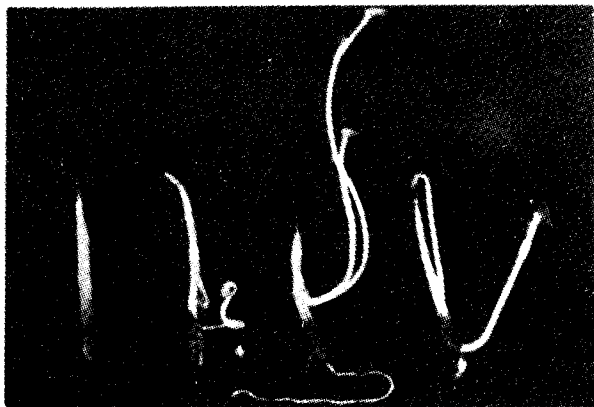
Stężenie regulatorów wzrostu ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) <sup>*</sup>  Growth regulators concentration ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) <sup>*</sup>	Liczba dojrzałych nasion Number of ripe seeds											
	Stężenie agaru (%) Agar concentration (%)											
	0				0,5				0,8			
	Faza rozwojowa izolowanej łuszczyzny Developmental stage of isolated silique											
	I	II	III	$\bar{x}$	I	II	III	$\bar{x}$	I	II	III	$\bar{x}$
0	3	8	4	5,0	1	3	3	2,3	2	2	3	2,3
0,5 NAA	1	5	4	3,3	2	2	4	2,7	0	4	5	3,0
1,0 NAA	0	1	3	1,3	1	2	1	1,3	0	4	2	2,0
0,5 BAP	2	3	4	3,0	1	4	2	2,3	1	4	2	2,3
1,0 BAP	3	6	6	5,0	1	2	3	2,0	1	4	4	3,0
0,5 NAA + 0,5 BAP	0	1	6	2,3	0	3	6	3,0	2	6	6	4,7
1,0 NAA + 0,5 BAP	0	0	6	2,0	1	2	2	1,7	0	3	6	3,0
0,5 NAA + 1,0 BAP	0	3	5	2,7	1	3	2	2,0	0	4	2	2,0
1,0 NAA + 1,0 BAP	4	6	6	5,3	1	2	2	1,7	2	4	4	3,3
0,5 ABA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
1,0 ABA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
$\bar{x}$	1,4	3,7	4,9		1,0	2,5	2,8		0,9	3,9	5,2	
NUR <sub>0,05</sub> dla: LSD <sub>0,05</sub> for: <ul style="list-style-type: none"> <li>- regulatorów wzrostu (I) 0,56</li> <li>- stężenia agaru (II) 0,32</li> <li>- fazy rozwojowej (III) 0,32</li> <li>- interakcji (I x II) 0,94</li> <li>- interakcji (I x III) 0,94</li> <li>- interakcji (II x III) 0,55</li> </ul>												

\* każda kombinacja obejmowała 20 łuszczyzn

\* each combination was represented by 20 siliques

W niektórych łuszczyznach hodowanych na pożywce zestawionej również obserwowano zahamowanie dalszych etapów dojrzwania nasion i przedwczesne

ich kiełkowanie (rys.6). Niemniej w łuszczynach inkubowanych na pożywce zestalonej (0,8 % agaru) liczba dojrzałych nasion była największa (tab.4). Również w tych warunkach procent łuszczyn, w których dojrzewały nasiona, był najwyższy (tab. 3).



0            0,5 NAA            1,0 NAA            1,0 BAP

Stężenie regulatorów wzrostu ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )  
Growth regulators concentration ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )

Rys.6. Pęknięcie izolowanych łuszczyn rzepaku (odmiana Jet Neuf) w kulturach in vitro i kiełkowanie nasion (pożywka zestalona, okres inkubacji - 6 tygodni)

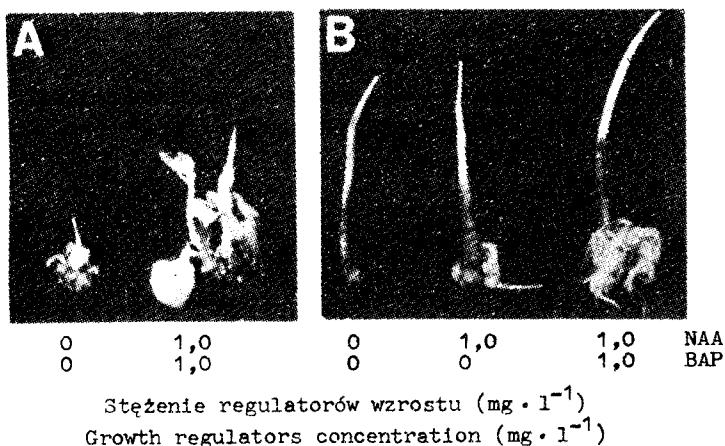
Fig.6. The splitting of isolated oilseed rape silicles (cv. Jet Neuf) in in vitro culture and seeds germination (solidified medium, incubation period - 6 weeks)

Analizując rolę regulatorów wzrostu w procesie dojrzewania nasion w izolowanych łuszczynach wykazano, iż regulatory wzrostu wpływały na liczbę nasion, współdziałając w tym procesie z badanymi czynnikami (faza rozwoju łuszczyny, stopień zestalenia pożywki). Wyniki te zostały potwierdzone przy zastosowaniu analizy statystycznej. Badanym regulatorem wzrostu z grupy auksyn był NAA. Związek ten odnośnie liczby wykształconych nasion okazał się efektywniejszy w stężeniu  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  niż w stężeniu  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Regulator wzrostu z grupy cytokinin, BAP, w stężeniu  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  wywierał stymulujący wpływ na dojrzewanie nasion w łuszczynach izolowanych w II i III fazie rozwojowej. Jednakże na kombinacji obu tych regulatorów wzrostu uzyskano lepsze wyniki. Wykazano, iż dla dojrzewania nasion w łuszczynach hodowanych na pożywce płynnej, najlepsze stężenie wynosiło  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, zaś na pożywce z 0,8 % agaru  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (tab. 4).

Regulatory wzrostu wpływały nie tylko na wydłużanie izolowanych łuszczyn i liczbę dojrzałych nasion, ale również indukowały proces różnicowania łuszczyn. Obecność NAA w pożywce miała stymulujący wpływ na tworzenie korzeni u ich nasady. Badana auksyna zastosowana w kombinacji z cytokininą indukowała tworzenie tkanki kalusowej (rys. 4, rys. 7B), korzeni (rys. 7B)



i pędów (rys. 7 A), przy czym zdolność do tworzenia pędów wykazały kuszczyny młodsze, izolowane w I fazie rozwojowej (rys. 7 A).



Rys.7. Wpływ regulatorów wzrostu na indukcję tkanki kalusowej i organogenezę izolowanych kuszczyn rzepaku (odmiana Jet Neuf) w kulturach in vitro: A - I faza rozwojowa, okres inkubacji - 9 tygodni, B - III faza rozwojowa, okres inkubacji - 6 tygodni

Fig.7. The effect of growth regulators on callus induction and organogenesis of isolated oilseed rape (cv. Jet Neuf) siliques in in vitro culture: A - I stage of development, incubation period - 9 weeks, B - III stage of development, incubation period - 6 weeks

Tak więc wykazano, iż badane czynniki endo- i egzogenne wpływały na morfogenezę izolowanych kuszczyn rzepaku i dojrzewanie w nich nasion. Najważniejszym z czynników była faza rozwojowa izolowanej kuszczyny, natomiast warunki kultury, takie jak stężenie agaru w pożywce i regulatory wzrostu, stanowiły czynniki drugorzędne, lecz również istotne.

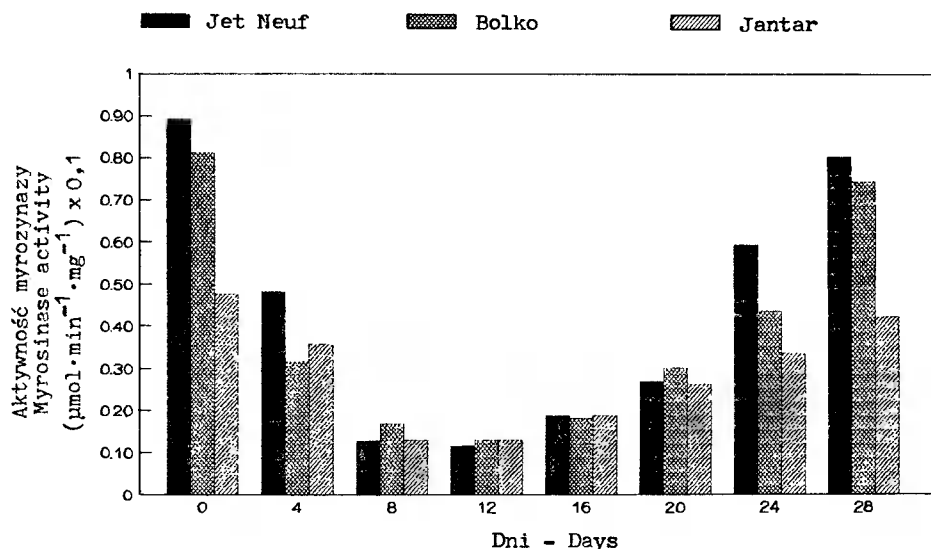
W oparciu o wnioski wypływające z tych doświadczeń przebadano wpływ kwasu absycynowego, związku uczestniczącego między innymi w procesach dojrzewania i starzenia. Miał on bardziej stymulujący wpływ na liczbę dojrziałych nasion niż pozostałe regulatory wzrostu. Podczas gdy w kuszczynach hodowanych na optymalnej kombinacji NAA+BAP liczba dojrziałych nasion wynosiła 6, pod wpływem ABA ilość ich zwiększała się do 10-13 (tab. 4). Ponadto obserwowano znany efekt ABA objawiający się zahamowaniem przedwczesnego kiełkowania nasion.

#### 4.1.2. Aktywność myrozynazy i występowanie komórek myrozynazowych w kulturach liścieni i wierzchołków pędów

Określenie warunków dla wzrostu i różnicowania eksplantatów rzepaku było etapem wstępnym do dalszych badań nad metabolizmem glukozyolanów. Wcześniejsze prace wykazały, iż w liścieniach rzepaku hodowanych w warunkach in vitro zachodzi szybki rozkład glukozyolanów [100]. Obecnie (w a-

nalogicznym doświadczeniu) analizowano aktywność myrozynazy, enzymu uczestniczącego w katabolizmie tych związków. Doświadczenia, które przeprowadzono na liścieniach rzepaku odmian zarówno wysoko- (Jet Neuf), jak i niskoglukozynolanowych (Bolko, Jantar) miały na celu przebadanie zależności między rozkładem glukozynolanów a aktywnością myrozynazy.

W materiale wyjściowym, a więc w liścieniach izolowanych z kiełkujących nasion, aktywność specyficzna enzymu była dość wysoka. Najwyższą aktywność stwierdzono w liścieniach odmian Bolko i Jet Neuf, w których była ona prawie o połowę wyższa niż u odmiany Jantar (rys. 8).



Rys.8. Kształtowanie się aktywności specyficznej myrozynazy w kulturach *in vitro* liścieni rzepaku badanych odmian w trakcie ich wzrostu i różnicowania (pożywka MS + 1,86 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 2,25 mg · l<sup>-1</sup> BAP) NUR<sub>0,05</sub> dla odmian, czasu i interakcji odmian x czas - wartości istotne

Fig.8. Specific myrosinase activity in oilseed rape cotyledons of investigated cultivars grown *in vitro* culture during their growth and differentiation (MS medium + 1,86 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 2,25 mg · l<sup>-1</sup> BAP). LSD<sub>0,05</sub> for cultivars, time and interaction cultivar x time - significant values

W ciągu pierwszego tygodnia kultury liścieni zachodził gwałtowny spadek aktywności enzymu. Poczynając od 8 dnia inkubacji, aktywność myrozynazy u trzech badanych odmian była zbliżona i bardzo niska. Utrzymywała się ona na tym poziomie przez kilka kolejnych dni, po czym następował stopniowy wzrost aktywności enzymu. Wskazuje to na możliwość syntezy myrozynazy w warunkach kultur *in vitro*. W czterotygodniowych liścieniach wraz z wyróżnionymi pędami aktywność myrozynazy była zbliżona do aktywności w materiale wyjściowym (rys. 8).

Pośród przebadanych trzech odmian rzepaku, liścienie odmiany Jet Neuf wykazały najlepsze zdolności do organogenezy (tab. 1). Porównano więc aktywność myrozynazy w czterotygodniowych liścieniach tej odmiany, będących w kolejnych etapach różnicowania. Jak wynika z rysunku 8 i tabeli 5, proces organogenezy liścieni związany był ze wzrostem aktywności enzymu. Znacznie niższą aktywność stwierdzono natomiast w liścieniach, na których tworzyła się tkanka kalusowa oraz w liścieniach, które tylko powiększały się (tab. 5).

Tabela 5  
Table 5

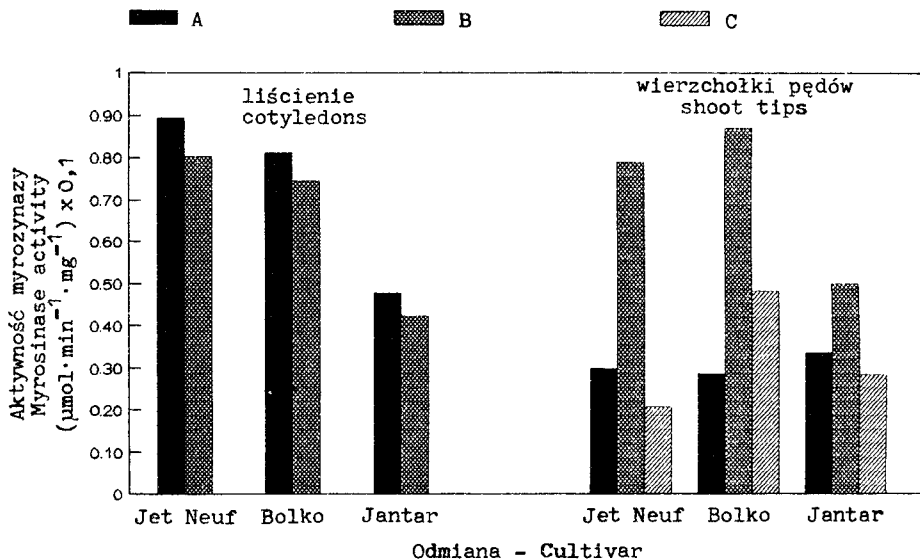
Porównanie aktywności specyficznej myrozynazy w liścieniach rzepaku (odmiana Jet Neuf) w kolejnych etapach ich różnicowania (pożywka MS +  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, okres inkubacji - 4 tygodnie)  
Comparison of specific myrosinase activity in oilseed rape cotyledons (cv. Jet Neuf) during their differentiation (MS medium +  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, incubation period - 4 weeks)

Etap różnicowania Stage of differentiation	Aktywność myrozynazy ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) Myrosinase activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
Liścienie powiększone Enlarged cotyledons	0,0163
Liścienie z wyróżnicowaną tkanką kalusową Cotyledons forming callus	0,0082
Liścienie tworzące pędy i korzenie Cotyledons forming shoots and roots	0,0737
NUR <sub>0,05</sub> LSD <sub>0,05</sub>	0,0040

Aktywność enzymu w roślinach uzyskanych z liścieni i wierzchołków pędów była zbliżona (rys. 9). Zdolności morfogenetyczne wierzchołków pędów zależały od obecności regulatorów wzrostu w pożywce, które wpływały również na aktywność myrozynazy. W odtworzonych z wierzchołków pędów pojedynczych roślinach (pożywka bez regulatorów wzrostu) aktywność enzymatyczna była zbliżona do aktywności w materiale wyjściowym. Natomiast proces namnażania, będący wynikiem inkubacji eksplantatów na pożywkę z  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP związany był ze znacznym wzrostem aktywności enzymu (rys. 9). Wyniki te popierają hipotezę o możliwości syntezy myrozynazy w kulturach in vitro, jak też wskazują na powiązania między aktywnością enzymu a regulatorami wzrostu indukującymi różnicowanie organów.

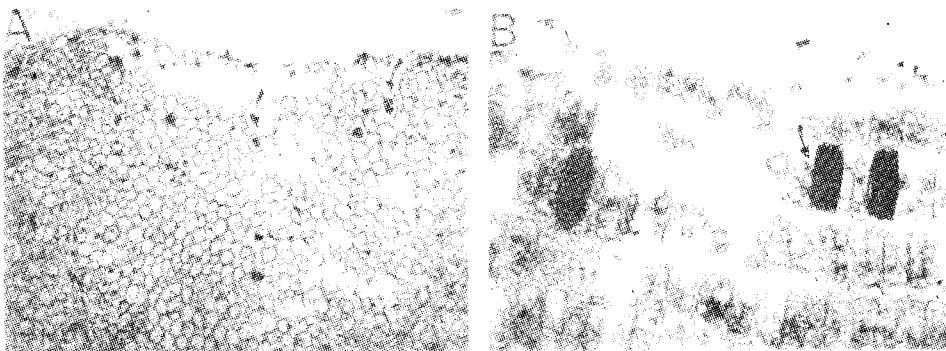
W dalszym etapie pracy badano zależności między zróżnicowaną aktywnością enzymu a występowaniem komórek myrozynazowych. Obecność ich stwierdzono w materiale wyjściowym, a więc w liścieniach, które izolowano z kiełkujących nasion. Stosując specyficzne na myrozynazę przeciwciała i znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym lub peroksydazą wykazano, iż występowały

one w parenchymie liścieni, zarówno u odmiany wysokoglukozynolanowej (Jet Neuf), jak i ulepszonej (Bolko). Inne części dojrzałego zarodka (jak np. korzenie), również zawierały komórki myrozynazowe rozmieszczone w zewnętrznych warstwach kory pierwotnej (rys. 10).



Rys.9. Porównanie aktywności specyficznej myrozynazy w różnicujących się liścieniach i wierzchołkach pędów siewek rzepaku w kulturach in vitro; A - materiał wyjściowy, B - po 4 tygodniach wzrostu na pożywce z  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, C - po 4 tygodniach wzrostu na pożywce bez regulatorów wzrostu

Fig.9. Comparison of specific myrosinase activity in differentiated oilseed rape cotyledons and seedling shoot tips; A - initial material, B - after 4 weeks of growth on the medium with  $1,86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $2,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP, C - after 4 weeks of growth on the medium without growth regulators



Rys.10. Występowanie komórek myrozynazowych w liścieniu rzepaku odmiany Jet Neuf (A) i wierzchołku korzenia odmiany Bolko (B) po trzech dniach kiełkowania (x 240)

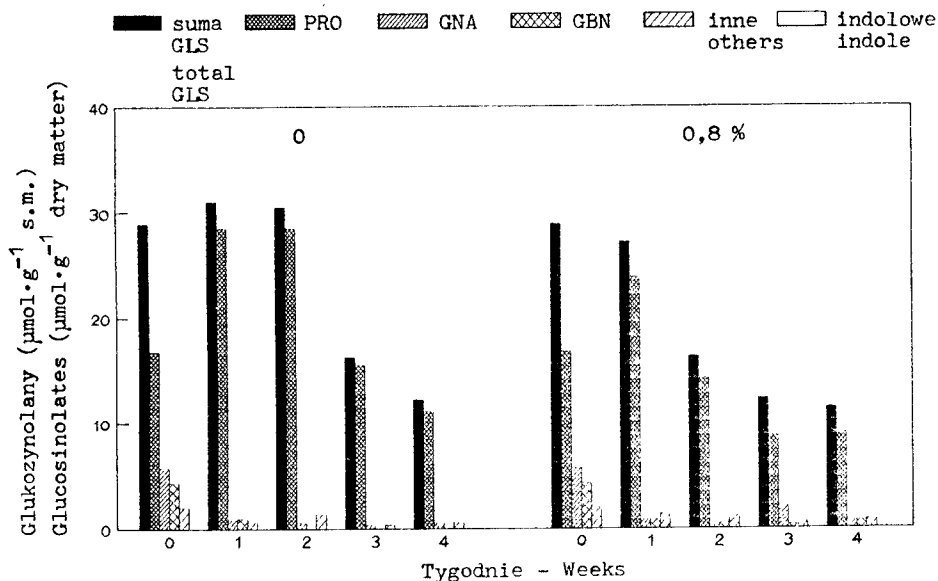
Fig.10. Occurrence of myrosin cells in cotyledon of Jet Neuf cultivar (A) and root tip of Bolko cultivar (B) germinated for 3 days (x 240)

Natomiast badania przeprowadzone na materiale pochodzącym z kultur in vitro, a więc na czterotygodniowych wyróżnicowanych roślinach, nie wykazały obecności komórek myrozynazowych.

#### 4.1.3. Glukozynolany, aktywność myrozynazy i występowanie komórek myrozynazowych w kulturach łuszczyń

Kolejny etap badań nad metabolizmem glukozynolanów związany był z fazą generatywną rzepaku, a więc okresem intensywnej syntezy i akumulacji glukozynolanów w nasionach. Jak wykazano, poziom glukozynolanów w izolowanych łuszczykach rzepaku zależał od odmiany i warunków kultury.

W łuszczykach odmiany Jet Neuf, w pierwszym tygodniu ich kultury na pożywce płynnej (bez agaru), jak i zestalonej (0,8 % agaru), stwierdzono wzrost zawartości niektórych glukozynolanów. Dalszemu rozwojowi izolowanych łuszczyń towarzyszyło obniżenie poziomu glukozynolanów. Początkowo proces ten przebiegał wolniej w łuszczykach rozwijających się na pożywce płynnej niż agarowej. Po czterech tygodniach inkubacji poziomy glukozynolanów w łuszczykach hodowanych na pożywce płynnej i zestalonej były zbliżone (rys. 11, tab. 6).



Rys.11. Kształtowanie się poziomu glukozynolanów w rozwijających się w kulturach in vitro łuszczykach rzepaku (odmiana Jet Neuf) w zależności od stężenia agaru (0; 0,8 %) w pożywce (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP)

Fig.11. Glucosinolate content in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf) siliques in in vitro culture depending on agar concentration (0; 0,8 %) in the medium (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP)

Tabela 6  
Table 6

Kształtowanie się poziomu glukozynolanów ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  s.m.) w rozwijających się w kulturach in vitro kuszczynach rzepaku (odmiany Jet Neuf i Bolko, pożywka MS +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP)  
Glucosinolate content ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  dry matter) in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf and Bolko) siliques in in vitro culture (MS medium +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  NAA +  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP)

Glukozynolany Glucosinolates	Stężenie agaru (%) - Agar concentration (%)									
	0									
	Okres inkubacji (tygodnie) - Incubation period (weeks)									
1	1		2		3		4		5	
	0	2	3	4	1	2	3	4	7	8
	2	3	4	5	6	7	8	9	9	10
Jet Neuf										
Progocitryna Progoitrin	16,85	28,50	28,53	15,61	11,14	23,88	14,37	8,80	9,12	
Epi-progoitryna Epi-progoitrin	0	0	0	0	0,12	0	0,22	0,13	0	
Glukonapina Gluconapin	5,77	0,90	0,55	0,34	0,54	0,91	0,26	2,09	0,61	
Glukobrasikenapina Glucobrassicinapin	4,33	1,00	0	0	0	0,93	0,48	0,36	0,70	
Napoleiferyna Napoleiferin	2,00	0,60	1,00	0,36	0,47	1,11	1,02	0,25	0,36	
Glukorafanina Glucoraphanin	0	0	0,40	0	0	0,27	0	*	0,19	
Glukoallisyne Glucallysin	0	0	0	0	0	0	0	*	0,27	
4-OH-glukobrasycyna 4-OH-glucobrassicin	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	
Glukobrasycyna Glucobrassicin	0	0	0	0	0	*	0	0	0,17	
Suma Total	28,95	31,00	30,48	16,30	12,27	27,14	16,36	12,33	11,43	

cd. tabeli 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	B o l k o								
Progoitryna	6,80	1,74	0,99	0,98	0,98	2,36	3,37	3,27	3,00
Progoitrin									
Epi-progoitryna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epi-progoitrin									
Glukonapina	0	0	0	0	0	0	0	0,22	0
Glucanapin									
Glukobrassikanapina	0	0	0	0	0	0	0,28	0,35	0
Glucobrassicinapin									
Napoleiferyna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Napoleiferin									
Glukorafanina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucorafanin									
Glukoalilisyna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukoalysin									
4-OH-glukobrassicyna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-OH-glucobrassicin									
Glukobrassicyna	0,54	0	0	0	0	0,35	0,23	0,20	0,20
Glukobrassicin									
Suma	7,34	1,74	0,99	0,98	0,98	2,71	3,88	4,04	3,20
Total									

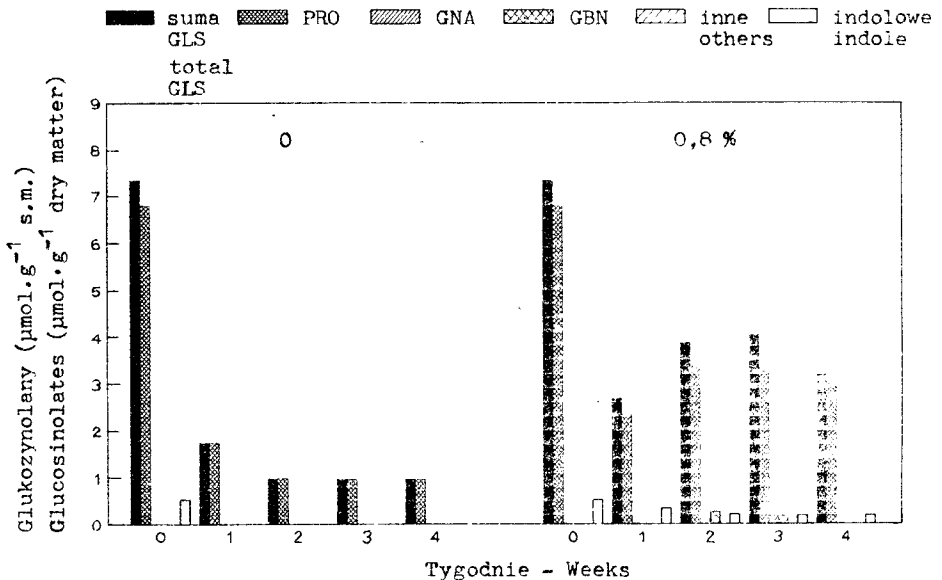
\* slad

\* trace

Warunki kultury łuszczyzn miały wpływ nie tylko na zawartość glukozynolanów, ale również na ich skład. Związane jest to niewątpliwie z wykazanym wcześniej wpływem tego czynnika na liczbę dojrzałych nasion. Więcej nasion dojrzewało w łuszczyznach, które hodowano na pożywce zestalonej i w tych łuszczyznach stwierdzono obecność wszystkich analizowanych glukozynolanów alkenylowych i indolowych (tab. 6). Spośród glukozynolanów alkenylowych dominowała progoitryna, która jest głównym glukozynolanem nasion rzepaku. Jej zawartość w czterotygodniowym okresie inkubacji obniżyła się mniej więcej o połowę. Pozostałe glukozynolany w czterotygodniowych łuszczyznach obecne były w niewielkich ilościach (rys. 11, tab. 6).

W łuszczyznach, które rozwijały się na pożywce płynnej, również dominowała progoitryna, przy czym jej poziom obniżał się wolniej niż w łuszczyznach hodowanych na pożywce agarowej. W łuszczyznach czterotygodniowych stwierdzono ponadto nieznaczne ilości glukonapiny i napoleiferyny (tab. 6).

Natomiast w izolowanych łuszczyznach rzepaku odmiany Bolko poziom glukozynolanów był znacznie niższy niż u odmiany Jet Neuf. W trakcie dojrzewania łuszczyzn ulegał on obniżeniu, lecz zmiany te były mniej gwałtowne niż u odmiany Jet Neuf (tab. 6). Dominującym glukozynolanem była także progoitryna i głównie jej zawartość decydowała o sumie glukozynolanów. Tylko w łuszczyznach hodowanych na pożywce agarowej stwierdzono obecność jednego z glukozynolanów indolowych - glukobrassicyny (rys. 12).

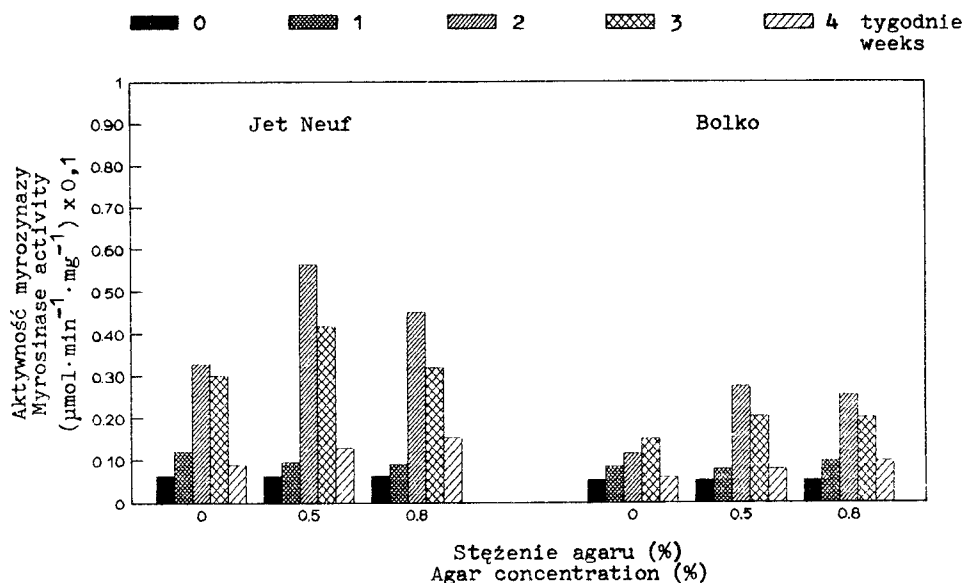


Rys.12. Kształtowanie się poziomu glukozynolanów w rozwijających się w kulturach in vitro łuszczyznach rzepaku (odmiana Bolko) w zależności od stężenia agaru (0; 0,8 %) w pożywce (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP)

Fig.12. Glucosinolate content in developing oilseed rape (cv. Bolko) siliques in in vitro culture depending on agar concentration (0; 0,8 %) in the medium (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP)



Zmiany w zawartości glukozyzolanów skorelowane były z aktywnością myrozynazy. W materiale wyjściowym, a więc w łuszczykach izolowanych około ósmego dnia po zapłodnieniu, aktywność myrozynazy była bardzo niska (rys. 13 oraz rys. 17). W okresie pierwszych dwóch tygodni zachodził wzrost elongacyjny łuszczyk oraz powiększanie nasion. Procesom tym towarzyszyło podwyższenie aktywności enzymu. Było ono większe w łuszczykach odmiany Jet Neuf niż Bolko. W dalszym etapie wzrostu łuszczyk w kulturach *in vitro* następowało obniżenie aktywności myrozynazy (rys. 13).



Rys.13. Kształtowanie się aktywności specyficznej myrozynazy w rozwijających się w kulturach *in vitro* łuszczykach rzepaku (odmiany Jet Neuf i Bolko) w zależności od stężenia agaru w pożywce (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP). NUR<sub>0,05</sub> dla czasu, odmiany i interakcji czas x odmiana - wartości istotne

Fig.13. Specific myrosinase activity in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf and Bolko) siliques in *in vitro* culture depending on agar concentration in the medium (MS + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> NAA + 1,0 mg · l<sup>-1</sup> BAP). LSD<sub>0,05</sub> for time, cultivar and interaction time x cultivar - significant values

Poza czynnikiem genetycznym (odmiana), badane czynniki egzogenne miały również wpływ na aktywność myrozynazy. Jednym z nich był stopień zestalenia pożywki. Wykazano, iż aktywność myrozynazy była wyższa w łuszczykach hodowanych na pożywce zestalonej (0,5 %, 0,8 % agaru) niż na płynnej (bez agaru), (rys. 13).

Wpływ regulatorów wzrostu następnego z badanych czynników egzogennych przedstawia tabela 7. Auksyna i cytokinina zastosowane pojedynczo, jak i w kombinacji, wpływały na podwyższenie aktywności enzymu w łuszczykach inkubowanych na pożywce zestalonej, przy czym wahała się ona w granicach

od 0,0014 do 0,0346  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Natomiast w łuszczykach inkubowanych na pożywce płynnej aktywność enzymu była bardzo niska (od 0,0041 do 0,0068  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), ale również ulegała podwyższeniu pod wpływem regulatorów wzrostu. Te zależności pozostają w związku z liczbą nasion dojrzewających w łuszczykach hodowanych w kulturach in vitro. Wykazano bowiem wcześniej, iż regulatory wzrostu współdziałały ze stopniem zestalania pożywki mając istotny wpływ na zwiększenie liczby dojrzałych nasion w łuszczykach hodowanych na pożywce zestalanej.

Tabela 7  
Table 7

Kształtowanie się aktywności specyficznej myrosynazy ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) w rozwijających się w kulturach in vitro łuszczykach rzepaku (odmiana Jet Neuf) w zależności od stężenia agaru i regulatorów wzrostu w pożywce (okres inkubacji - 4 tygodnie)

Specific myrosinase activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf) siliques in in vitro culture, depending on agar and growth regulators concentration in the medium (incubation period - 4 weeks)

Rodzaj i stężenie regulatorów wzrostu ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) Kind and concentration of growth regulators ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Stężenie agaru (%) Agar concentration (%)		
	0	0,8	$\bar{x}$
0	0,0041	0,0014	0,0028
0,5 NAA	0,0054	0,0236	0,0145
1,0 NAA	0,0068	0,0182	0,0125
0,5 BAP	0,0039	0,0039	0,0039
1,0 BAP	0,0053	0,0191	0,0122
0,5 NAA + 0,5 BAP	0,0062	0,0129	0,0095
1,0 NAA + 0,5 BAP	0,0048	0,0084	0,0066
0,5 NAA + 1,0 BAP	0,0068	0,0346	0,0207
1,0 NAA + 1,0 BAP	0,0046	0,0150	0,0098
$\bar{x}$	0,0053	0,0152	
NUR <sub>0,05</sub> dla: LSD <sub>0,05</sub> for:			
- regulatorów wzrostu - growth regulators	(I)	0,0032	
- stężenia agaru - agar concentration	(II)	0,0016	
- interakcji - interaction	(I x II)	0,0047	

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, iż formowanie zarodka i dojrzewanie nasion zachodziło szybciej w łuszczykach hodowanych na pożywce zestalanej niż płynnej. Jednak zmiany w zawartości glukozyolanów (odmiana Bolko) oraz aktywności myrosynazy (odmiana Jet Neuf) w łuszczykach hodowanych na obu rodzajach pożywek były skorelowane, co wykazano przy zastosowaniu analizy statystycznej (tab. 8).

Tabela 8  
Table 8

Współczynniki korelacji liniowych dla aktywności myrozynazy i sumy glukozynolanów w hodowanych in vitro łuszczykach rzepaku odmian Jet Neuf i Bolko

Linear correlation coefficients for myrosinase activity and total glucosinolate content in in vitro grown oilseed rape siliques of Jet Neuf and Bolko cultivars

Aktywność myrozynazy Myrosinase activity		Suma glukozynolanów Total glucosinolate content	
Stężenie agaru Agar concentration			
0		0,8 %	
$x_1$	$x_3$	$x_2$	$x_4$
Jet Neuf			
$x_2$	0,223		
$x_3$	0,954*	0,166	
$x_4$	-0,403	-0,523	0,741
Bolko			
$x_2$	-0,575		
$x_3$	0,837	-0,636	
$x_4$	-0,328	0,922*	-0,356

\* wartości istotne dla  $\alpha_{0,05}$

\* significant values for  $\alpha_{0,05}$

Badane czynniki endo- i egzogenne miały wpływ na poziom glukozynolanów i aktywność myrozynazy. Można jednak stwierdzić, iż zakończenie embriogenezy (łuszczyzny dwutygodniowe) związane było z obniżeniem zarówno zawartości glukozynolanów, jak i aktywności myrozynazy.

W badanym materiale nie wykazano obecności komórek myrozynazowych nawet w okresie maksymalnej aktywności enzymu (kultury dwutygodniowe). Można więc sądzić, że aktywność myrozynazy nie jest uwarunkowana występowaniem komórek myrozynazowych.

#### 4.2. In vivo - rośliny rzepaku uprawiane w polu

##### 4.2.1. Kształtowanie się poziomu glukozynolanów i aktywności myrozynazy oraz występowanie komórek myrozynazowych w łuszczykach

Badania nad metabolizmem glukozynolanów w kulturach in vitro organów pochodzenia generatywnego uzupełniono następnie badaniami przeprowadzonymi na łuszczykach rzepaku uprawianego w polu. Dniom po zapłodnieniu, w któ-

rych wykonano analizy, odpowiadają kolejne stadia rozwojowe zarodka i etapy dojrzewania nasion (patrz tab. 15).

U odmiany Jet Neuf całkowita zawartość glukozyzolanów w słupekach przed zapłodnieniem wynosiła  $30,35 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$  tkanki (tab. 9). W ciągu pierwszych trzech dni embriogenezy następował nieznaczny wzrost poziomu glukozyzolanów, po czym ich zawartość obniżała się. W łuszczykach, w których znajdowały się zarodki w stadium torpedy (17 dni po zapłodnieniu), poziom glukozyzolanów wzrósł ponownie i wynosił  $32,98 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$  tkanki (tab. 9, rys. 14).

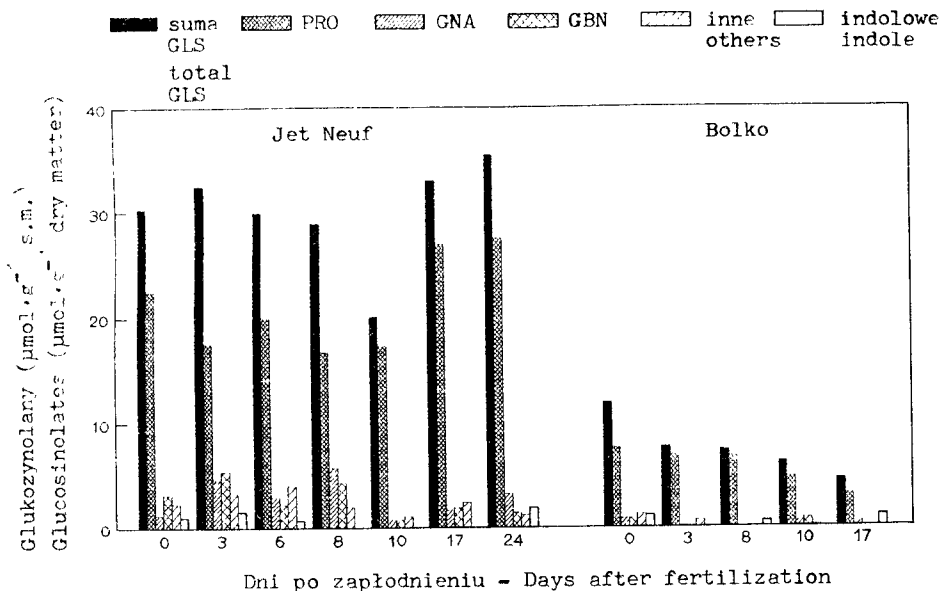
W łuszczykach odmiany niskoglukozyzolanowej - Bolko, w okresie formowania zarodka (do stadium torpedy), stwierdzono powolny spadek całkowitej zawartości glukozyzolanów (rys. 14).

Analizując występowanie poszczególnych glukozyzolanów w badanym materiale stwierdzono, iż w słupekach odmiany Jet Neuf, podobnie jak w nasionach rzepaku, dominującym glukozyzolanem była progoitryna. Jej zawartość w rozwijających się łuszczykach była niższa niż w słupekach. Pod koniec embriogenezy stwierdzono jednak znaczny wzrost poziomu progoitryny. Drugim pod względem ilościowym glukozyzolanem obecnym w słupekach była glukobras-sikanapina. Poziom jej w łuszczykach, w których znajdowały się dojrzałe zarodki, był niższy niż przed zapłodnieniem. Formowanie zarodka związane było ze wzrostem zawartości napoleiferyny i glukonapiny. Spośród glukozyzolanów indolowych w słupekach i bardzo młodych łuszczykach (do szóstego dnia po zapłodnieniu) obecna była glukobrassicyna (tab. 9).

Słupki odmiany Bolko zawierały mniej progoitryny niż słupki odmiany Jet Neuf. W rozwijających się łuszczykach odmiany podwójnie ulepszonej poziomy głównych glukozyzolanów alkenylowych zmieniały się wykazując tendencje spadkowe (tab. 9, rys. 14). W słupekach i łuszczykach tej odmiany obecny był jeden z glukozyzolanów indolowych - glukobrassicyna, ale odmiennie niż u odmiany Jet Neuf zawierały go również łuszczyki starsze (17 dni po zapłodnieniu), (tab. 9).

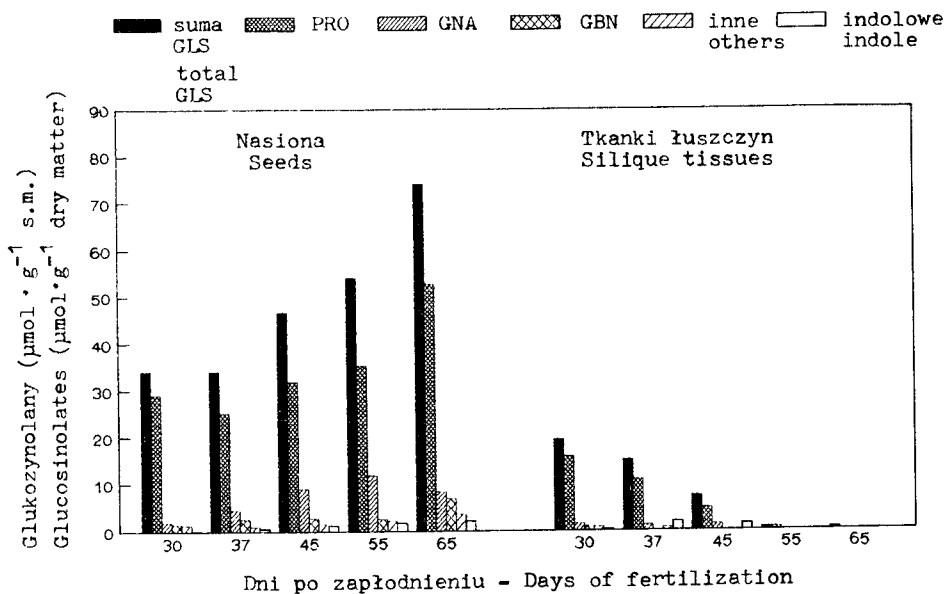
Po wykształceniu w pełni rozwiniętego zarodka (otoczonego zieloną okrywą nasienną) rozpoczyna się proces dojrzewania nasion. Związany on jest z akumulacją suchej masy spowodowaną dalszą, intensywną syntezą materiałów zapasowych i różnych metabolitów wtórnych. Zewnętrznym przejawem tego procesu u rzepaku jest twardnienie okrywy nasiennej i zmiana jej zabarwienia. Proces dojrzewania nasion rzepaku obu badanych odmian związany był z dalszą akumulacją glukozyzolanów w nasionach i obniżeniem ich zawartości w tkankach łuszczyk spowodowanym najprawdopodobniej ich transportem do nasion (tab. 10 oraz tab. 11).

W zielonych nasionach rzepaku odmiany Jet Neuf w największej ilości występowała progoitryna oraz jej izomer, epi-progoitryna. W następnej kolejności kształtowały się poziomy glukonapiny, glukobrassikanapiny i napoleiferyny. W miarę dojrzewania nasion zawartość tych glukozyzolanów wzrastała, z wyjątkiem epi-progoitryny. Spośród glukozyzolanów indolowych w dojrzewających nasionach obecna była 4-OH-glukobrassicyna (tab. 10, rys. 15).



Rys.14. Kształtowanie się poziomu glukozyzolanów w rozwijających się łuszczynach rzepaku (odmiany Jet Neuf i Bolko)

Fig.14. Glucosinolate content in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf and Bolko) siliques



Rys.15. Kształtowanie się poziomu glukozyzolanów w trakcie dojrzewania nasion i tkanek łuszczyn rzepaku (odmiana Jet Neuf)

Fig.15. Glucosinolate content in oilseed rape (cv. Jet Neuf) seeds and siliques tissues during ripening

Tabela 9  
Table 9

Kształtowanie się poziomu glukozynolanów ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  s.m.)  
w rozwijających się łuszczykach rzepaku odmian Jet Neuf i Bolko  
Glucosinolate content ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  dry matter)  
in developing oilseed rape siliques of Jet Neuf and Bolko cultivars

Glukozynolany Glucosinolates	Jet Neuf											Bolko					
	Dni po zapłodnieniu - Days after fertilization																
	0	3	6	8	10	17	24	0	3	8	10	17	0	3	8	10	17
Progoitryna Progoitrin	22,54	17,57	20,02	16,85	17,34	26,92	27,48	7,70	6,91	6,80	3,04						
Epi-progoitryna Epi-progoitrin	0	0,23	0,17	0	0,19	0,46	0,26	0	0	0	0	0	0	0	*	0	0
Glukonapina Gluconapin	1,24	4,62	2,98	5,77	0,79	1,70	3,26	0,89	0,11	0	0,38						
Glukobrasikanapina Glucobrasicanapin	3,16	5,44	2,29	4,33	0,80	1,89	1,46	0,93	*	0	0	0	0	0,79	0	0	0
Napoleiferyna Napoleiferin	1,49	1,74	2,22	2,00	0,94	2,01	0,17	0,63	0,62	0	0,15						
Glukorafanina Glucoraphanin	0	0,35	0,34	0	0	0	0,19	0,30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukoallisyne Glucosin	0,88	1,01	1,32	0	0	0	0,24	0,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-OH-glukobrasycyna 4-OH-glucobrassicin	0	*	0	0	0	0	1,89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukobrasycyna Glucobrassicin	1,04	1,49	0,73	0	*	0	0	1,17	0	0,54	1,15						
Suma - Total	30,35	32,45	30,07	28,95	20,12	32,98	34,95	11,97	7,71	7,34	4,57						

\* ślad

Kształtowanie się poziomu glukozyolanów ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$ )  
w dojrzewających nasionach oraz tkankach łuszczyń rzepaku (odmiana Jet Neuf)  
Glucosinolate content ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  dry matter)  
in oilseed rape (cv. Jet Neuf) seeds and silique tissues during ripening

Glukozyolany Glucosinolates	Stadium dojrzałości nasion (barwa nasion) - Stage of seed ripeness (seed colours)													
	zielone green			ciemnozielone dark-green			zielono-brązowe green-brown			brązowe brown			czarne black	
	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń tissues
Progoitryna Progoitrin	20,97	14,49	24,22	10,84	31,06	4,82	34,33	0,61	46,95	0				
Epi-progoitryna Epi-progoitrin	8,14	1,31	1,08	0,19	0,89	0	1,12	0	5,70	0				
Glukonapina Gluconapin	1,98	1,52	4,59	1,18	9,00	1,22	11,88	0	8,44	0				
Glukobrasikanapina Glucobrassicinapin	1,52	0,89	2,60	0,11	2,87	0	2,62	0	6,91	0				
Napoleiferyna Napoleiferin	0,99	0,91	1,06	0,69	1,19	0	1,50	0	3,15	0				
Glukorafanina Glucoraphanin	0,27	*	*	0	0,14	0	0,44	0	0,59	0				
Glukoallisyna Glucosallisin	0	0	*	*	0,16	*	0,32	0	0	0				
4-OH-glukobrasycyna 4-OH-glucobrassicin	*	0,41	0,28	1,76	1,20	1,38	1,80	0	2,20	0				
Glukobrasycyna Glucobrassicin	0,12	*	0,21	0,24	0,13	*	0	0	0,13	0				
Suma - Total	33,99	19,43	34,04	15,01	46,64	7,42	54,01	0,61	74,07	0				

\* ślad - trace

Kształtowanie się poziomu glukozynolanów ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  s.m.)  
w dojrzewających nasionach oraz tkankach łuszczyń rzepaku (odmiana Bolko)  
Glucosinolate content ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  dry matter)  
in oilseed rape (cv. Bolko) seeds and silique tissues during ripening

Glukozynolany Glucosinolates	Stadium dojrzałości nasion (barwa nasion) - Stage of seed ripeness (seed colours)											
	zielone green			zielono-brązowe green-brown			brązowe brown			czarne black		
	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues	nasiona seeds	tkanki łuszczyń silique tissues
Progoitryna Progoitrin	4,11	1,72	4,73	1,05	4,82	0,36	2,96	0				
Epi-progoitryna Epi-progoitrin	*	0	*	0	0	0	0	0				0
Glukonapina Gluconapin	1,01	0,81	0,52	0	1,22	0	1,66	0				0
Glukobrasssikanapina Glucobrassicinapin	0,17	0	0,79	0	0	0	0,11	0				0
Napoleiferyna Napoleiferin	*	0	0,15	0	0	0	0	0				0
Glukorafanina Glucoraphanin	*	0	0	0	0	0	0	0				0
Glukoallisyjna Glucoallisin	*	0	0	0	0	0	0,12	0				0
4-OH-glukobrasssicyjna 4-OH-glucobrassicin	0,13	0	0	0	1,38	0	2,45	0				0
Glukobrasssicyjna Glucobrassicin	0,18	0,16	*	0	*	0	0,16	0				0
Suma - Total	5,60	2,69	6,19	1,05	7,42	0,36	7,46	0				0

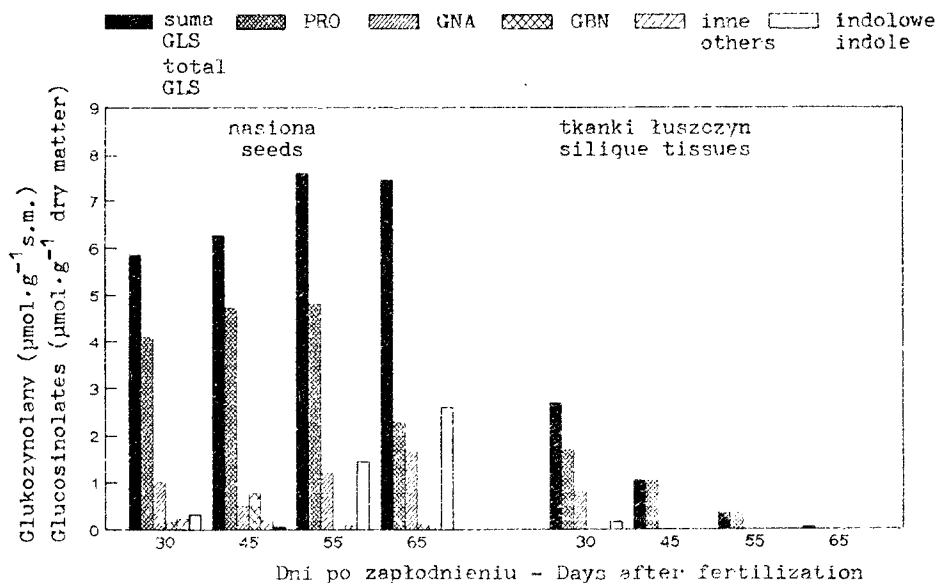
\* ślad - trace



Podczas gdy w dojrzewających nasionach zachodziła synteza i akumulacja glukozynolanów, w starzejących się tkankach łuszczyń całkowita zawartość glukozynolanów ulegała obniżeniu (tab. 10, rys. 15). Wykazano ujemną korelację między zmianami w poziomie glukozynolanów w dojrzewających nasionach i tkankach łuszczyń (patrz tab. 13).

Analizując skład ilościowy poszczególnych glukozynolanów, w początkowym okresie dojrzewania stwierdzono podobną zawartość glukonapiny i napoleiferyny w tkankach łuszczyń i nasionach. W tym stadium poziomy pozostałych glukozynolanów alkenylowych i indolowych były w tkankach łuszczyń niższe niż w nasionach (tab. 10). W tkankach łuszczyń najwolniej obniżał się poziom progoitryny, która, jako jedyny glukozynolan, była w nich jeszcze obecna, kiedy nasiona były brązowe (rys. 15).

Również w dojrzewających nasionach odmiany niskoglukozynolanowej - Bolko, zachodziła akumulacja glukozynolanów, a ich obniżenie w tkankach łuszczyń (rys. 16). Inaczej jednak kształtowały się stosunki ilościowe między poszczególnymi glukozynolanami (tab. 11). W nasionach zielonych obecne były wszystkie analizowane glukozynolany, chociaż niektóre w ilościach śladowych. Natomiast dojrziałe nasiona (czarne) zawierały progoitrynę, glukonapinę, glukobrassikanapinę i glukoallisynę. Mimo iż następowała synteza glukozynolanów w kolejnych etapach dojrzewania nasion, poziom progoitryny w nasionach czarnych był niższy niż w nasionach zielonych. Dojrzałe nasiona rzepaku odmiany Bolko zawierały nieco wyższy poziom glukozynolanów indolowych niż dojrziałe nasiona odmiany Jet Neuf. Glukozynolany indolowe w nasionach odmiany Bolko stanowiły 35 % sumy wszystkich glukozynolanów, natomiast w nasionach Jet Neuf 3,2 %.



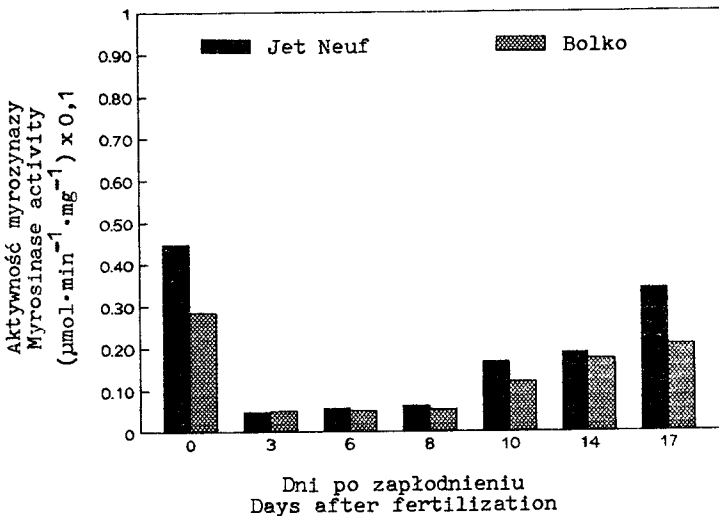
Rys.16. Kształtowanie się poziomu glukozynolanów w trakcie dojrzewania nasion i tkanek łuszczyń rzepaku (odmiana Bolko)

Fig.16. Glucosinolate content in oilseed rape (cv. Bolko) seeds and silique tissues during ripening

W tkankach łuszczyń zawierających nasiona zielone stwierdzono niski poziom progoitryny, glukonapiny i glukobrassicyny. W kolejnych badanych etapach dojrzewania łuszczyń obecna była w nich tylko progoitryna, której zawartość ulegała obniżeniu (tab. 11, rys. 16).

Wykazano pewne podobieństwa w kształtowaniu się poziomu glukozynolanów w łuszczyinach rzepaku odmiany Jet Neuf rozwijających się w kulturach in vitro (pożywka płynna) i na roślinach uprawianych w polu. Bez względu na pochodzenie łuszczyń formowanie zarodka związane było ze wzrostem poziomu glukozynolanów. W obu typach łuszczyń, w których znajdowały się wykształcone zarodki, zawartość glukozynolanów była zbliżona (tab. 6 oraz tab. 9). Porównując poziomy poszczególnych glukozynolanów w tych łuszczyinach stwierdzono, iż pod koniec embriogenezy wszystkie glukozynolany (wyjątek stanowiła progoitryna) były obecne w mniejszych ilościach w łuszczyinach hodowanych in vitro.

Po określeniu kształtowania się zawartości glukozynolanów podczas embriogenezy oraz dojrzewania nasion przebadano następnie aktywność myrozynazy i jej związek z występowaniem komórek myrozynazowych. W stadium poprzedzającym embriogenezę, a więc w słupekach izolowanych z pąków kwiatowych, aktywność myrozynazy była wyższa niż w łuszczyinach analizowanych w okresie embriogenezy. Odbiciem różnic w poziomie glukozynolanów u badanych odmian była prawie dwukrotnie wyższa aktywność myrozynazy w słupekach odmiany wysokoglukozynolanowej (Jet Neuf), niż podwójnie ulepszonej (Bolko), (rys. 17).



Rys.17. Kształtowanie się aktywności specyficznej myrozynazy w rozwijających się łuszczyinach rzepaku (odmiany Jet Neuf i Bolko).  $NUR_{0,05}$  dla odmiany i stadium rozwojowego zarodka - wartości istotne, dla interakcji odmiana x stadium rozwojowe zarodka - wartości nieistotne

Fig.17. Specific myrosinase activity in developing oilseed rape (cv. Jet Neuf and Bolko) silicles.  $LSD_{0,05}$  for cultivar and stage of embryo development - significant values, for interaction cultivar x stage of embryo development - insignificant values

Jak wynika z rysunku 17, przekształcenie się słupek w owoc związane było ze spadkiem aktywności enzymatycznej. Aktywność myrozynazy w łuszczykach utrzymywała się na bardzo niskim poziomie do około ósmego dnia po zapłodnieniu (początek stadium sercowatego zarodka), po czym stopniowo wzrastała. W kolejnych etapach embriogenezy była ona u obu odmian zbliżona, lecz zawsze nieco wyższa u odmiany Jet Neuf.

Proces dojrzewania nasion związany był z dalszym wzrostem aktywności myrozynazy. Maksymalną aktywność enzymu stwierdzono w dojrzałych nasionach odmiany Jet Neuf i była ona prawie 2 razy wyższa niż w nasionach odmiany Bolko (tab. 12).

Tabela 12

Table 12

Kształtowanie się aktywności specyficznej myrozynazy ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) w dojrzewających nasionach oraz tkankach łuszczyk rzepaku odmian Jet Neuf i Bolko

Specific myrosinase activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) in oilseed rape cv. Jet Neuf and Bolko seeds and silique tissues during ripening

Stadium dojrzałości nasion (barwa nasion) Stage of seed ripeness (seed colours)	Aktywność myrozynazy ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) Myrosinase activity ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )					
	Nasiona Seeds			Tkanki łuszczyk Silique tissues		
	Jet Neuf	Bolko	$\bar{x}$	Jet Neuf	Bolko	$\bar{x}$
Zielone Green	0,0458	0,0387	0,0422	0,0151	0,0168	0,0159
Ciemnozielone Dark-green	0,0560	0,0402	0,0581	0,0148	0,0072	0,0110
Zielono-brązowe Green-brown	0,0678	0,0513	0,0595	0,0076	0,0070	0,0073
Brązowe Brown	0,0841	0,0692	0,0766	0,0066	0,0059	0,0062
Czarne Black	0,2188	0,1289	0,1738	0	0	0
$\bar{x}$	0,0945	0,0657		0,0088	0,0075	
NUR <sub>0,05</sub> dla: LSD <sub>0,05</sub> for: <ul style="list-style-type: none"> <li>- odmian (I) 0,0127 *</li> <li>- stadium dojrzałości nasion (II) 0,0202 0,0038</li> <li>- interakcji (I x II) 0,0286 *</li> </ul>						

\* nieistotna - insignificant

Inaczej niż w nasionach kształtowała się aktywność myrozynazy w tkankach łuszczyk. Była ona w nich znacznie niższa i w miarę dojrzewania ulegała dalszemu obniżeniu (tab. 12).

Akumulacja glukozyolanów w dojrzewających nasionach i obniżenie ich poziomu w tkankach łuszczyn oraz towarzyszące temu zmiany w aktywności myrozynazy są ze sobą ściśle powiązane. Dla odmiany Jet Neuf stwierdzono istotnie dodatnie korelacje między aktywnością myrozynazy a poziomem glukozyolanów w nasionach i tkankach łuszczyn (tab. 13), natomiast u odmiany Bolko - tylko w tkankach łuszczyn (tab. 14).

W łuszczynach pochodzących z roślin uprawianych w polu, podobnie jak w łuszczynach hodowanych *in vitro*, badano zależność między aktywnością myrozynazy a występowaniem komórek myrozynazowych. Niska aktywność enzymu podczas embriogenezy związana była z brakiem komórek myrozynazowych. Ich obecność stwierdzono około trzydziestego dnia po zapłodnieniu (zakończenie embriogenezy, początek dojrzewania nasion). Bez względu na różnice w aktywności myrozynazy u badanych odmian, komórki myrozynazowe stwierdzono we wszystkich organach rozwiniętego zarodka (tab. 15). Od otaczających je komórek różniły się one zarówno kształtem jak i wielkością (rys. 18 C). Rozmieszczone były wśród komórek parenchymy liścieni lub kory pierwotnej hypokotyli i korzeni. Badania ultrastruktury tych komórek wykazały obecność licznych oleosomów otaczających ziarna myrozynowe (rys. 20 B). Na rysunku 20 widoczne są ponadto jądro komórkowe, mitochondria i plastydy. Podczas procesu dojrzewania nasion, ziarna myrozynowe powiększały się na skutek zlewania się drobnych ziaren w większe (rys. 19 A i B). W końcowym etapie embriogenezy stwierdzono ponadto w liścieniach zarodka komórki zawierające białko zapasowe, zlokalizowane w ziarnach aleuronowych (rys. 20). Poczynając od tego stadium oba rodzaje komórek, myrozynazowe i aleuronowe, obecne były w zarodkach dojrzewających nasion.

W tkankach łuszczyn i rozwijającego się zarodka, w których aktywność myrozynazy nie była zbyt wysoka, nie stwierdzono obecności typowych komórek myrozynazowych (rys. 18 B). Jednak badając słupki i bardzo młode łuszczyny wykryto w nich obecność nowego typu idioblastów białkowych, dotychczas nie opisanych w tych tkankach (rys. 18 A). Były one podobne do komórek myrozynazowych, nie zawierały jednak ani ciał myrozynowych charakterystycznych dla komórek myrozynazowych (rys. 18 C), ani ciał aleuronowych związanych z komórkami, w których gromadzone jest białko zapasowe. Występowanie tych idioblastów, ograniczone do wczesnych etapów fazy generatywnej, skorelowane było z nieznaczną aktywnością myrozynazy, co może sugerować, iż zawierają ten enzym.

Podsumowując wyniki dotyczące aktywności myrozynazy w łuszczynach hodowanych *in vitro* i pochodzących z roślin uprawianych w polu można stwierdzić, iż w obu przypadkach, począwszy od ósmego dnia po zapłodnieniu do zakończenia embriogenezy, aktywność enzymu była podobna. W dwutygodniowych kulturach łuszczyn, w których obecne były nasiona z wykształconym zarodkiem, aktywność była nieco wyższa niż w łuszczynach pochodzących z pola. Czynniki, które wpływały na wzrost łuszczyn *in vitro* i dojrzewanie w nich nasion, miały również wpływ na wzrost aktywności myrozynazy.

W kulturach *in vitro* liścieni, wierzchołków pędów siewek i łuszczyn, w których aktywność myrozynazy była niska, nie stwierdzono występowania ko-

mórek myrozynazowych. W dojrzewających in situ nasionach z obecnością komórek myrozynazowych skorelowana była wysoka aktywność myrozynazy. Komórki myrozynazowe stwierdzono zarówno w nasionach odmiany Jet Neuf, jak i Bolko. Wykazano jednak różnice w aktywności enzymatycznej między tymi odmianami.

Tabela 13

Table 13

Współczynniki korelacji liniowych dla aktywności myrozynazy i sumy glukozynolanów w dojrzewających nasionach i tkankach łuszczyń rzepaku (odmiana Jet Neuf)

Linear correlation coefficients for myrosinase activity and total glucosinolate content in oilseed rape (cv. Jet Neuf) seeds and silique tissues during ripening

	Nasiona Seeds		Tkanki łuszczyń Silique tissues	
	aktywność myrozynazy myrosinase activity $x_1$	suma glukozynolanów total glucosi- nolate content $x_2$	aktywność myrozynazy myrosinase activity $x_3$	suma glukozynolanów total glucosi- nolate content $x_4$
$x_2$	0,912*			
$x_3$	-0,878	-0,988**		
$x_4$	-0,708	-0,932*	0,925*	

\* wartości istotne dla  $\alpha_{0,05}$  - significant values for  $\alpha_{0,05}$

\*\* wartości istotne dla  $\alpha_{0,01}$  - significant values for  $\alpha_{0,01}$

Tabela 14

Table 14

Współczynniki korelacji liniowych dla aktywności myrozynazy i sumy glukozynolanów w dojrzewających nasionach i tkankach łuszczyń rzepaku (odmiana Bolko)

Linear correlation coefficients for myrosinase activity and total glucosinolate content in oilseed rape (cv. Bolko) seeds and silique tissues during ripening

	Nasiona Seeds		Tkanki łuszczyń Silique tissues	
	aktywność myrozynazy myrosinase activity $x_1$	suma glukozynolanów total glucosi- nolate content $x_2$	aktywność myrozynazy myrosinase activity $x_3$	suma glukozynolanów total glucosi- nolate content $x_4$
$x_2$	0,696			
$x_3$	-0,827	-0,849		
$x_4$	-0,750	-0,905	0,985*	

\* wartości istotne dla  $\alpha_{0,05}$  - significant values for  $\alpha_{0,05}$

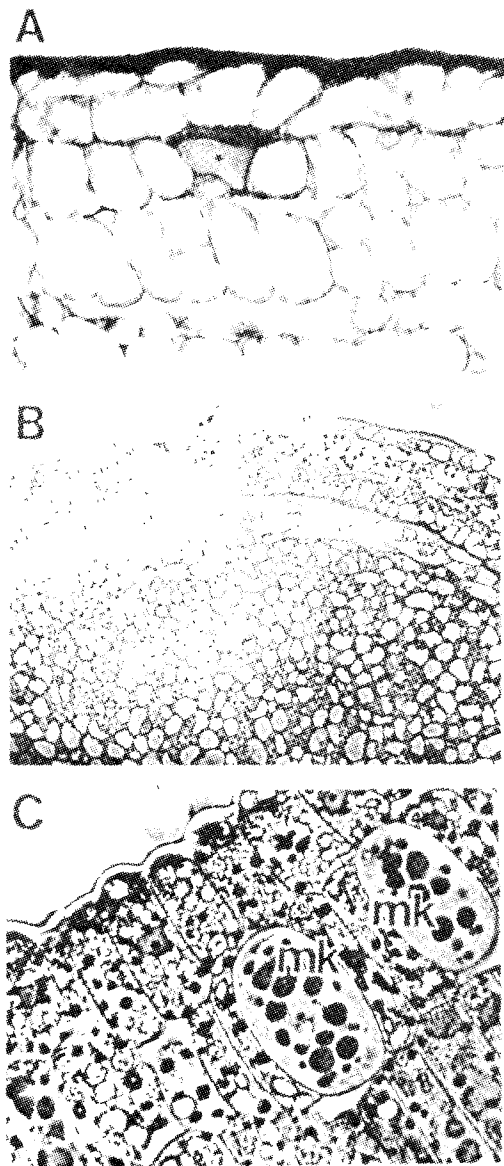
Występowanie komórek myrozynazowych w zarodkach  
i łuszczykach rzepaku podczas embriogenezy i dojrzewania nasion  
The occurrence of myrosin cells in oilseed rape embryos  
and siliques during embryogenesis and seed ripeness

Dni po zapłod- nieniu Days after fertiliz- ation	Stadium rozwojowe zarodka Developmental stage of embryo	Analizowany materiał Analysed material	Występowanie komórek myrozynazowych Occurrence of myrosin cells	
			Odmiana - Cultivar	
			Jet Neuf	Bolko
0	zarodek niewykształcony undeveloped embryo	słupek pistil	*	*
Embriogeneza - Embryogenesis				
3	4 - 8 komórek 4 - 8 cells	ściana łuszczyzny siliques walls	*	*
8	sercowate heart	zarodek embryo ściana łuszczyzny siliques walls	- *	- *
17	torpeda torpeda	zarodek embryo ściana łuszczyzny siliques walls	- -	- -
30	zarodek rozwinięty embryo is developed	liścienie cotyledons hypokotyl hypocotyl wierzchołek korzenia root tip ściana łuszczyzny siliques walls	+ + + -	+ + + -
Dojrzewanie nasion - Seed ripeness				
Barwa okrywy nasiennej Seed coat colour				
45	zielono-brązowa green-brown	ściana łuszczyzny siliques walls	-	-
55	brązowa brown	ściana łuszczyzny siliques walls	-	-
65	czarna black	liścienie cotyledons hypokotyl hypocotyl wierzchołek korzenia root tip ściana łuszczyzny siliques walls	+ + + -	+ + + -

\* idioblasty, komórki zawierające białko, nie będące typowymi komórkami  
myrozynazowymi  
idioblasts, cells with protein but not typical myrosin cells

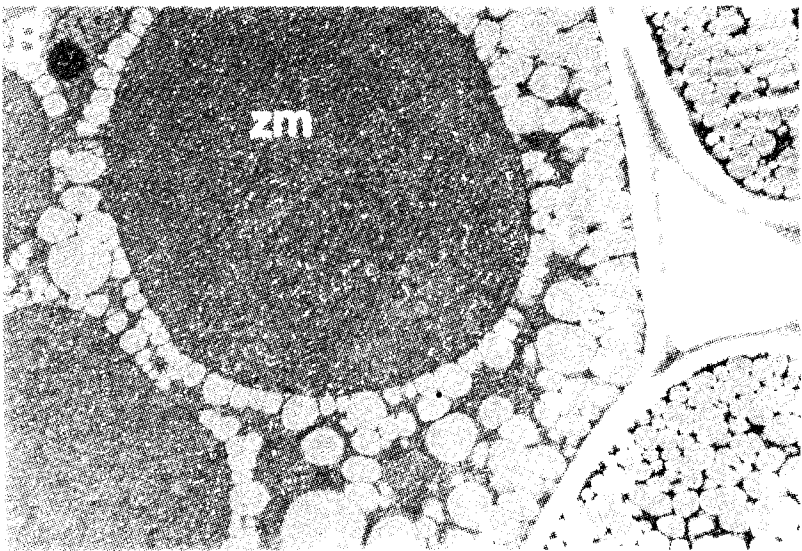
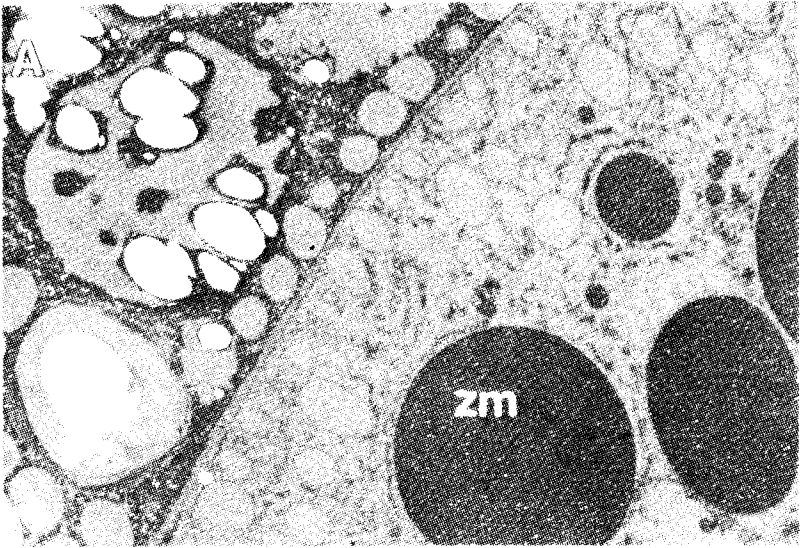
+ komórki myrozynazowe  
myrosin cells

- brak komórek myrozynazowych  
myrosin cells are absent



Rys.18. Przekroje poprzeczne przez fragment tkanek łuszczyzny (A) oraz liścieni zarodka (B, C) rzepaku odmiany Bolko: A - \* idioblast białkowy, B - brak idioblastów białkowych i myrozynazowych (około 8 dnia po zapłodnieniu), C - komórki myrozynazowe (mk) (około 30 dni po zapłodnieniu) (40x Ph)

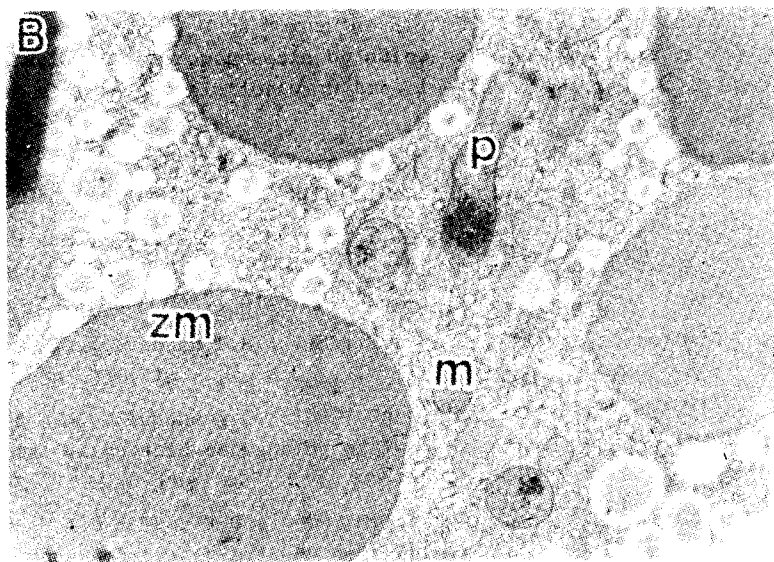
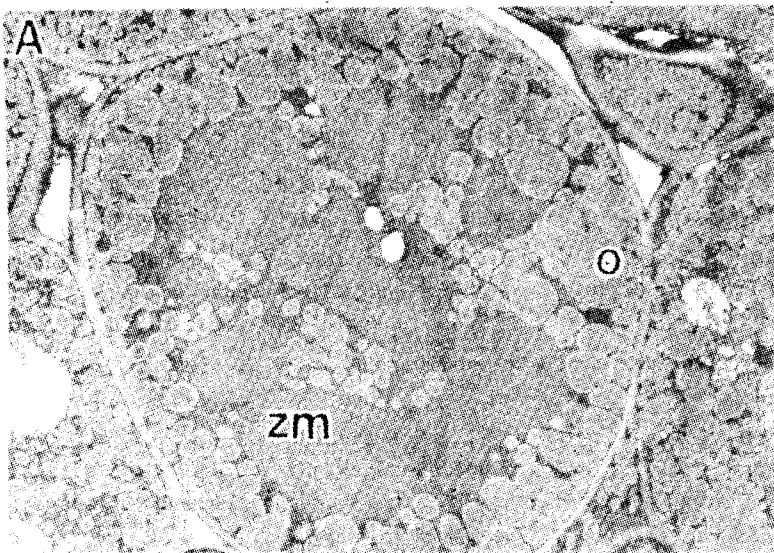
Fig.18. Cross section through a fragment of siliqua tissue (A) and embryo cotyledons (B, C) of oilseed rape cv. Bolko: A - \* protein idioblast, B - protein and myrosin idioblasts are absent (ca 8 days after fertilization), C - myrosin cells (mk) (ca 30 days after fertilization), (40x Ph)



Rys.19. Elektronogramy komórek myrozynazowych liścieni rzepaku odmiany Bolko z widocznymi ziarnami myrozynazowymi (zm): A - po 30 dniach, B - po 60 dniach od zapłodnienia (x4000)

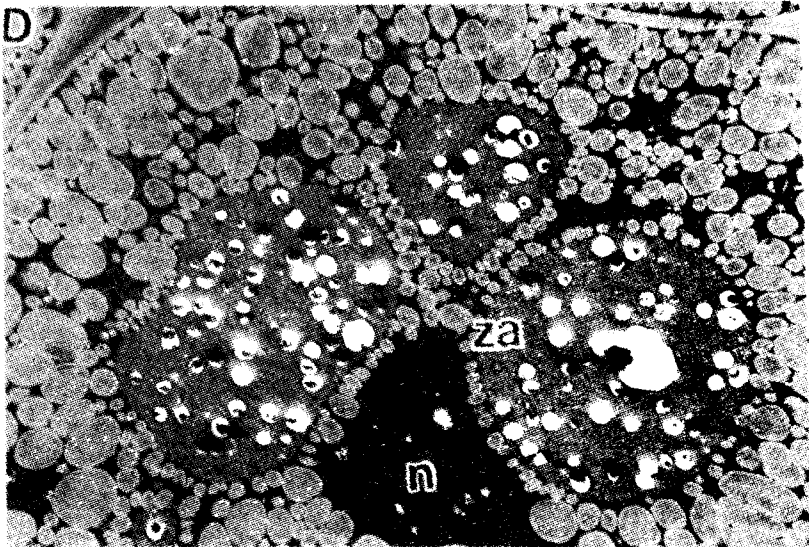
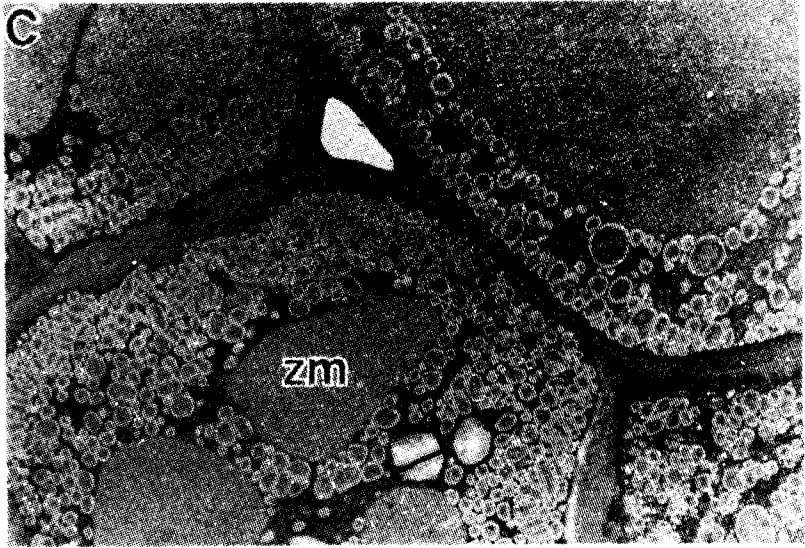
Fig.19. Electron micrographs of the cotyledon myrosin cells of oilseed rape cv. Bolko with myrosin grains (zm): A - 30 days, B - 60 days after fertilization (x4000)





Rys.20.A,B. Elektronogramy komórek myrozynazowych liścieni zarodka (A,B) rzepaku odmiany Jet Neuf: zm - ziarna myrozynowe, o - oleosomy, m - mitochondria, p - plastydy (A x 2500, B x 8000)

Fig.20.A,B. Electron micrographs of cotyledon (A,B) myrosin cells of oilseed rape cv. Jet Neuf: zm - myrosin grains, o - oleosomes, m - mitochondria, p - plastids (A x 2500, B x 8000)



Rys.20.C,D. Elektronogramy komórek myrosynazowych wierzchołka korzenia (C) oraz komórki aleuronowej liścienia rzepaku (D) odmiany Jet Neuf: zm - ziarna myrosynowe, n - jądro, za - ziarna aleuronowe (C x 3000, D x 4000)

Fig.20.C,D. Electron micrographs of root tip (C) myrosin cells and cotyledon aleurone cell (D) of oilseed rape cv. Jet Neuf: zm - myrosin grains, n - nucleus, za - aleurone grains (C x 3000, D x 4000)

## 5. DYSKUSJA

Proces morfogenezy roślin zintegrowany jest z metabolizmem podstawowym i wtórnym. Występujące u rzepaku glukozynolany są metabolitami wtórnymi, których obecność obniża rolnicze znaczenie tej rośliny. W obszernej literaturze dotyczącej glukozynolanów niewiele jest danych o ich metabolizmie, jak i o fizjologicznej roli w roślinie. Zastosowana w niniejszej pracy metoda kultur in vitro pozwoliła prześledzić morfogenezę izolowanych eksplantatów rzepaku (liścienie, wierzchołki pędów, łuszczyzny), w powiązaniu z zachodzącym w tych organach katabolizmem glukozynolanów (izolowane liścienie) oraz ich syntezą i akumulacją (izolowane łuszczyzny do drugiego tygodnia inkubacji).

Duża zdolność do regeneracji rodzaju Brassica zależna od odmiany [32, 51, 108] została wykorzystana w procesie różnicowania liścieni rzepaku. Czynniki egzogennymi, które wywołują różnicowanie izolowanych liścieni w kulturach in vitro są regulatory wzrostu. Jak wykazano, wyższym potencjałem morfogenetycznym charakteryzowały się liścienie odmiany wysokoglukozynolanowej (Jet Neuf) niż liścienie odmian podwójnie ulepszonych (Bolko i Jantar). Prawie dwukrotnie wyższa, w porównaniu z odmianą Jet Neuf, była zdolność do tworzenia pączków pędowych na liścieniach innej odmiany wysokoglukozynolanowej - Skrzyszowicki [99]. Ze względu na dużą łatwość do organogenezy w kulturach in vitro, liścienie rzepaku wydają się być dobrym układem modelowym dla różnorodnych badań przydatnych w programie hodowlanym tej rośliny, podobnie jak liścienie *B. juncea* [109].

Procesy metaboliczne oraz różnicowanie komórek, tkanek i organów są ze sobą zharmonizowane, a mechanizmy ich regulacji działają na różnych poziomach organizacji [31]. Rozwój nasion zależy od transportu do nich asymilatów, związków mineralnych i wody, z których powstają substancje strukturalne i zapasowe. Fizjologiczne powiązania między rośliną mateczną a rozwijającymi się nasionami ograniczają identyfikowanie poszczególnych czynników wpływających na rozwój nasion oraz akumulację i syntezę metabolitów pierwotnych i wtórnych. Przydatność metody kultur in vitro w badaniach nad dojrzewaniem nasion i ich składem chemicznym wykazano u lucerny, soi i grochu [3, 89, 122].

Ważnym czynnikiem endogennym wpływającym na wzrost i dojrzewanie izolowanych strąków i łuszczyzn w kulturach in vitro jest faza rozwojowa izolowanego organu [2, 89, 112]. W tkankach łuszczyzn rzepaku, które dostarczają rozwijającym się nasionom 32 % asymilatów [12], intensywna produkcja suchej masy rozpoczyna się około 12 dnia po kwitnieniu [44]. Również dalszy rozwój w kulturach in vitro izolowanych zarodków zależy od ich wieku i jest możliwy dopiero po zakończeniu stadium kulistego - fazy heterotroficznej [98]. Prawdopodobnie dlatego więcej nasion dojrzewało w badanych łuszczyznach rzepaku, w których podczas izolacji znajdowały się zarodki starsze (w stadium sercowatym).



Wzrost i rozwój izolowanych łuszczyn rzepaku zależał również od regulatorów wzrostu, które wpływały na liczbę dojrzałych nasion współdziałając w tym procesie z pozostałymi badanymi czynnikami (wiek izolowanej łuszczyny, stopień zestalenia pożywki). Egzogenne regulatory wzrostu (IAA, K, BAP, GA<sub>3</sub>) stymulowały dojrzewanie strąków lucerny i grochu oraz mieszańcowych załączni rodzaju *Brassica* w kulturach *in vitro* [2, 3, 122]. Zapotrzebowanie na egzogenne regulatory wzrostu wynika z roli jaką fitohormony odgrywają w embriogenezie i w procesie dojrzewania nasion. Podczas embriogenezy rozwój młodych łuszczyn rzepaku oraz ich liczba pozostają pod kontrolą cytokinin i IAA [22]. Kwas indolilo-3-octowy wpływa na liczbę nasion, akumulację asymilatów oraz rozwój tkanek łuszczyn. Inny regulator wzrostu, ABA, który nagromadza się w łuszczynach w okresie wypełniania nasion, uczestniczy w akumulacji suchej masy i zapobiega ich przedwczesnemu kiełkowaniu [34]. Obecne w pożywce regulatory wzrostu uzupełniają więc pulę hormonów, która w nasionach roślin *in situ* jest składową ich transportu i akumulacji, jak i syntezy oraz wykorzystania [13, 121]. Również elementy strukturalne plonu, takie jak: liczba nasion w łuszczynie, liczba strąków lub łuszczyn na roślinie oraz masa 1000 nasion, mogą ulec zwiększeniu pod wpływem egzogenne zastosowanych regulatorów wzrostu [20, 45, 82, 107].

O liczbie nasion w łuszczynach rzepaku decyduje między innymi liczba zapłodnionych zalążków, z których rozwiną się nasiona [92]. Jak wykazali Wojciechowski i Niedziela [125] w łuszczynach rzepaku odmiany *Jet Neuf*, średnia liczba zalążków wynosi 33, natomiast liczba dojrzałych nasion tylko 17-24. Jedną z przyczyn tej różnicy może być zapłodnienie tylko komórki jajowej i związany z tym brak bielma, zaopatrującego młody zarodek w substancje odżywcze [92]. Można więc przypuszczać, iż obniżona liczba nasion w łuszczynach hodowanych *in vitro*, w porównaniu z łuszczynami roślin uprawianych w polu, była wynikiem niezapłodnienia wszystkich zalążków. Mniejsza liczba nasion wskazuje również, iż do rozwoju wymagają one specyficznych substancji, które w normalnych warunkach są transportowane z rośliny matecznej, a których nie zawierała pożywka syntetyczna. Jednakże uzyskana w niniejszych badaniach liczba nasion/łuszczynę w kulturach *in vitro* była znacznie wyższą od uzyskanej przez Bajaja i in. [2].

Morfogenezie izolowanych eksplantatów w kulturach *in vitro* towarzyszył aktywny metabolizm glukozyolanów. W kulturach izolowanych liścieni rzepaku, podobnie jak i liścieni *B. juncea*, zachodził katabolizm glukozyolanów [90, 100]. Dalszemu ich wzrostowi i regeneracji towarzyszyła synteza *de novo* glukozyolanów, uwarunkowana jednak pasażowaniem różnicujących się eksplantatów na świeżą pożywkę [90]. Aktywność myrozynazy w izolowanych liścieniach trzech badanych odmian rzepaku ulegała obniżeniu w początkowym okresie ich hodowli, procesowi zaś organogenezy towarzyszył wzrost aktywności enzymatycznej. Wyższą aktywność enzymu w kalusie z wyróżnicowanymi pędami, niż w kalusie nieróżnicującym się wykazał wcześniej Bones [8]. Myrozynazyna poprzez rozkład glukozyolanów, które mogą być dla rośliny źródłem siarki, dostarcza prekursorów niezbędnych do syntezy metabolitów siarkowych [105]. Ponadto w wyniku hydrolizy glukozyolanów powstaje glu-

koza, która również może być związkiem odżywczym wykorzystywanym w różniących się pędach. Z kolei jej aktywna forma uczestniczy w wielu procesach metabolicznych. Tak więc myrozynaza jest przypuszczalnie włączona w stymulację procesów wzrostu i rozwoju, co już wcześniej sugerowali Pihakaski i Pihakaski [93].

Bardzo wyraźna zależność stwierdzono między aktywnością myrozynazy a poziomem glukozynolanów w kulturach *in vitro* łuszczyn rzepaku. Aktywność myrozynazy zależała zarówno od czynników endo-, jak i egzogennych. Czynniki, które stymulowały dojrzewanie nasion, zwiększały również aktywność enzymatyczną. Potwierdza to wcześniejsze doniesienie Bonesa [8] o możliwości syntezy myrozynazy w warunkach kultur *in vitro*.

Głównymi glukozynolanami nasion rzepaku są glukozynolany alkenylowe. Ich metabolizm w kulturach *in vitro* nie jest poznany. Na podstawie nielicznych badań można wnioskować, iż w kulturach tkankowych rodzaju *Brassica* nie zachodzi synteza *de novo* glukozynolanów alkenylowych [1, 41, 100, 120]. Zdolności do akumulacji i syntezy glukozynolanów nie posiadały również izolowane zarodki rzepaku [36], zaś synteza glukozynolanów w różniących się liścieniach *B. juncea* wymagała pasażowania eksplantatów na świeżą pożywkę [90]. Jak wykazano, kultury izolowanych łuszczyn rzepaku traciły w miarę dojrzewania zdolność syntezy glukozynolanów, co może wynikać z braku w pożywce odpowiednich składników lub prekursorów niezbędnych do syntezy glukozynolanów. Wyniki badań przeprowadzone na rzepaku *in situ* [54, 106] również świadczą o tym, iż składniki odżywcze podłoża są ważnym czynnikiem wpływającym na poziom glukozynolanów. Dodanie siarki do gleby z deficytem tego pierwiastka zwiększało syntezę glukozynolanów w nasionach *B. juncea* o 50% [60].

Inną próbą wyjaśnienia braku zdolności do syntezy *de novo* glukozynolanów alkenylowych w kulturach *in vitro* jest rola aminokwasów, a zwłaszcza metioniny w regulacji różnicowania izolowanych organów i tkanek. Wykazano bowiem, iż proliferacja kalusa u rodzaju *Brassica* związana jest z wysoką aktywnością enzymu deaminazy treoninowej. Katalizuje ona pierwszy etap biosyntezy izoleucyny, która jest jednym z aminokwasów kontrolujących biosyntezę metioniny [6].

W przeciwieństwie do nasion rodzaju *Brassica*, w których dominują glukozynolany alkenylowe, w kulturach tkankowych tego rodzaju przeważają glukozynolany indolowe - pochodne tryptofanu [41]. Ich obecność wykazano między innymi w kulturach komórkowych i kalusie *B. juncea* i *B. nigra* [35, 41]. Niewielką ich zawartość, obniżającą się w trakcie rozwoju, stwierdzono w kulturach *in vitro* łuszczyn odmiany Bolko. Była ona niższa niż w łuszczynach tej odmiany rozwijających się *in situ* i nie przekraczała 10% całkowitej zawartości glukozynolanów. U odmian „00” zawartość glukozynolanów indolowych może stanowić 50% całkowitej puli glukozynolanów [67]. Z tego względu uzyskanie genotypów o zredukowanym poziomie glukozynolanów indolowych jest obecnie przedmiotem zainteresowań hodowców rzepaku [67]. Bardzo niski poziom glukozynolanów indolowych w izolowanych łuszczynach odmiany Bolko, podobnie jak i Jet Neuf, wskazuje iż również ta grupa glukozynola-

nów nie jest syntetyzowana w kulturach *in vitro*. Funkcja fizjologiczna glukozynolanów indolowych nie jest w pełni poznana; wiadomo jednak, iż są one prekursorami auksyn [71]. Wyniki niniejszej pracy wykazały, iż glukozynolany indolowe mogą uczestniczyć w metabolizmie auksyn. Morfogeneza izolowanych łuszczyń, a zwłaszcza dojrzewanie w nich nasion, które stymulują auksyny [22], zachodziło przy obniżającym się poziomie glukozynolanów.

Liczne prace, w których badano aktywność myrozynazy [8, 9, 51] oraz zawartość glukozynolanów w różnych stadiach rozwojowych rzepaku [23-26, 79] nie wyjaśniają całkowicie zależności między enzymem a substratem. W liścieniach siewek rozwijających się *in vivo* zachodził katabolizm glukozynolanów [25, 79]. McGregor [79] uważa jednak, iż jest to wynik przeliczania zawartości glukozynolanów na parametry wzrostu, które zmieniają się wraz z rozwojem. Wyrażając zawartość glukozynolanów na roślinę, poziom tych związków wzrastał. Nie ma więc w siewkach zmniejszenia poziomu glukozynolanów netto lecz działa tu efekt rozcienczenia, w wyniku powiększania się organów [79].

Dyskusyjne są również wyniki uzyskane w badaniach nad aktywnością myrozynazy w rozwijających się siewkach rzepaku. Bones [8] donosi o spadku aktywności enzymatycznej w liścieniach siewek. Badania James'a i Rossiter'a [52] wykazały występowanie w siewkach rzepaku dwóch białek myrozynazowych o różnych właściwościach fizycznych. W liścieniach obecna była tylko myrozynaza II i jej aktywność wzrastała. Dotychczas nie wyjaśniono czy myrozynaza II jest posttranslacyjnym produktem enzymatycznej modyfikacji białka myrozynazy I, czy też odrębnym produktem genetycznym.

Iori i in. [46] badając zależności między aktywnością myrozynazy a syntezą glukozynolanów w nasionach odmian rzepaku różniących się poziomem glukozynolanów wykazali wyższą aktywność u odmiany „00” niż u odmian zawierających glukozynolany. Autorzy sugerują, iż podczas dojrzewania nasion odmian „00” myrozynaza reguluje proces degradacji glukozynolanów. Hipoteza ta pozostaje w sprzeczności z faktem stwierdzonym przez Josefssona [55], że u odmian podwójnie ulepszonych niska zawartość glukozynolanów jest spowodowana blokadą biosyntetycznego szlaku poprzedzającego powstanie jednego z pierwszych produktów pośrednich - aldoksyumu.

W dojrzewających nasionach rzepaku aktywność myrozynazy i zawartość glukozynolanów wzrastały i były wyższe u odmiany Jet Neuf niż Bolko. Aktywność myrozynazy jest więc zależna od poziomu glukozynolanów. Potwierdzeniem tego może być stwierdzone obniżenie aktywności enzymu w kulturach *in vitro* łuszczyń, kiedy traciły one zdolność do syntezy glukozynolanów. Brak glukozynolanów w badanych tkankach wskazuje, iż nie uaktywniają się geny odpowiedzialne za syntezę białka enzymatycznego. Regulacja aktywności myrozynazy odbywa się na zasadzie sprzężenia zwrotnego, które jest podstawowym mechanizmem samoregulacji przemian metabolicznych w organizmach żywych [77].

W rozwoju nasion rzepaku wyróżnia się trzy fazy: formowanie zarodka, powiększanie i dojrzewanie [88]. Z fazami tymi związana jest synteza i akumulacja metabolitów pierwotnych i wtórnych. W fazie pierwszej, w formu-

jącym się zarodku rozpoczyna się synteza związków tłuszczowych oraz glukozynolanów. Powiększanie zarodka (faza II) związane jest z aktywną syntezą głównych białek zapasowych rzepaku, krucyferyny i napiny oraz dalszym wzrostem poziomu glukozynolanów. Podczas fazy trzeciej syntetyzowane jest białko oleosyna, główny składnik membran ciał tłuszczowych [20, 85]. Akumulacja glukozynolanów w nasionach rzepaku zachodzi, w zależności od odmiany, z różną szybkością. Gijzen i in. [36] oraz Iori i in. [46] stwierdzili obecność glukozynolanów w nasionach już między 10 - 16 dniem po zapyleniu, natomiast De March i in. [23] dopiero około 26 dnia po zapyleniu. W analizowanych w niniejszej pracy łuszczynach odmiany Jet Neuf znaczne nagromadzenie glukozynolanów stwierdzono około 17 dnia po zapłodnieniu, a u odmiany Bolko - między 17 - 30 dniem. Podsumowując te dane można stwierdzić, iż akumulacja glukozynolanów w nasionach rzepaku rozpoczyna się pod koniec embriogenezy oraz skorelowana jest z syntezą białek i aminokwasów będących prekursorami glukozynolanów [120]. Równocześnie wyniki niniejszej pracy wykazały, iż synteza glukozynolanów poprzedzona jest wzrostem aktywności myrozynazy.

Różnice w czasie rozpoczęcia syntezy glukozynolanów w nasionach rzepaku są spowodowane zarówno różnicami odmianowymi, jak i warunkami środowiska, w których rzepak był uprawiany [5, 15, 49]. Nie bez znaczenia są też różne metody analityczne stosowane przez autorów, jak i niezbyt precyzyjne określenie części kwiatostamu, z której pobierano materiał. Położenie łuszczyny na roślinie jest bowiem bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na zawartość glukozynolanów w nasionach [11].

Akumulowane w nasionach rzepaku glukozynolany są syntetyzowane w częściach wegetatywnych rośliny oraz w łuszczynach [7, 23, 54, 56, 96, 105]. Aktywny transport glukozynolanów do pojedynczego nasienia trwa 6 - 8 dni [105]. De March i in. [23] nie wykluczając transportu glukozynolanów lub ich prekursorów z rośliny, wskazują dodatkowo na niezależną syntezę w nasionach. U obu badanych odmian rzepaku (Jet Neuf i Bolko), wzrostowi zawartości glukozynolanów w nasionach towarzyszyło obniżenie ich poziomu w tkankach łuszczyn. Ujemną korelację między tymi procesami stwierdzono tylko dla odmiany Jet Neuf. Brak statystycznie udowodnionej korelacji u odmiany Bolko tłumaczyć można tym, iż u odmian „OO” tkanki łuszczyn zawierają znaczne ilości pośrednich produktów biosyntezy glukozynolanów, które ze względu na specyficzną transportu nie mogą być dostarczone do nasion [105]. Spadek zawartości glukozynolanów w tkankach łuszczyn badanych odmian rzepaku, w kolejnych fazach dojrzewania, był jednak mniejszy niż wzrost ich poziomu w nasionach. Tak więc na całkowitą zawartość glukozynolanów w nasionach składa się prawdopodobnie transport glukozynolanów oraz ich prekursorów z łuszczyn i części wegetatywnych rośliny, biosynteza w nasionach oraz przekształcenia glukozynolanów w wyniku oksydacji, hydroksylacji lub utraty grup metylowych. Progoitryna i napoleiferyna mogą powstawać na drodze hydroksylacji glukonapiny i glukobrassicianapiny. Sugeruje się również, iż glukobrassicyna może być przekształcana do innych glukozynolanów indolowych [78]. Jej hydroksylacja do 4-CH-glukobrassicyny

zachodzi w nasionach, do których jest prawdopodobnie transportowana z łuszczyń [67].

Proces dojrzewania nasion rzepaku związany jest z anatomicznymi i biochemicznymi zmianami w tkankach łuszczyń prowadzącymi do ich pęknięcia. W komórkach strefy pękającej wzrasta aktywność celulazy, enzymu odpowiedzialnego za rozpad komórek tej strefy. Ważną rolę w procesie pęknięcia łuszczyń odgrywa produkowany przez nasiona etylen [80]. Spadek produkcji etylenu skorelowany jest z rozpoczynającym się procesem dojrzewania nasion [80], podczas którego nagromadzają się w nich między innymi glukozynolany alkenylowe. Prekursorem obu tych związków jest metionina, co może sugerować, iż w dojrzewających nasionach aktywność metaboliczna szlaku biosyntezy etylenu zostaje przesunięta w kierunku tworzenia glukozynolanów. Potwierdzeniem tego może być znacznie niższa produkcja etylenu przez tkanki łuszczyń, w których może zachodzić synteza glukozynolanów lub ich prekursorów [7, 23, 80].

Ważną cechą metabolizmu wtórnego jest organizacja przestrzenna w komórce - kompartmentacja. Enzymy metabolizmu wtórnego związane są z membranami cytoplazmatycznymi, podczas gdy produkty ich reakcji gromadzą się np. w wakuolach, strukturach Golgiego [77]. Glukozynolany, podobnie jak i myrozynaza, są oddzielone przestrzennie. Myrozynaza występuje w idioblastach, specyficznych komórkach myrozynazowych zawierających ziarna myrozynowe [9, 97, 119]. Najnowsze badania immunohistochemiczne sugerują, iż jest ona zlokalizowana w cytoplazmie komórek myrozynazowych lub na membranach otaczających ziarna myrozynowe. Glukozynolany zaś gromadzą się w wakuolach lub wewnątrz ziarn myrozynowych [116, 127]. Obecność myrozynazy wykazano również w cytoplazmie komórek szparkowych, komórek ksylemu i łuszczyń [43, 53]. W niniejszej pracy stwierdzono obecność nowego typu idioblastów białkowych podobnych do komórek myrozynazowych, nie zawierających jednak ciał myrozynowych. Występowały one w słupkach i młodych łuszczyńach, w których enzym wykazywał dość znaczną aktywność. Przypuszczenie, iż są one miejscem lokalizacji myrozynazy, potwierdziły wstępne badania immunohistochemiczne [27].

Literatura podaje uogólnienia o powiązaniach między obecnością komórek myrozynazowych a aktywnością myrozynazy. Wyniki niniejszej pracy zgodne są z wcześniejszymi badaniami Iversena i in. [47], iż aktywność myrozynazy nie musi być uwarunkowana obecnością komórek myrozynazowych. Ponadto badania własne bliżej określiły te zależności. W badanych tkankach i organach rzepaku, w których wykazano wysoką aktywność enzymu, stwierdzono obecność komórek myrozynazowych. Ich brak natomiast był akorelowany z niską aktywnością. W tym ostatnim przypadku enzym może być związany z cysternami retikulum endoplazmatycznego, frakcjami mitochondrialnymi i diktiosomami komórek [9, 120]. Z kolei w liścieniach hodowanych in vitro, jak podają Sharma i Bhojwani [108], komórki myrozynazowe mogą ulegać degradacji.

Obecność komórek myrozynazowych skorelowaną z aktywnością myrozynazy stwierdzono w zarodkach rzepaku odmian Jet Neuf i Bolko. Podobnie u innych przedstawicieli Brassicaceae komórki myrozynazowe różnicowały się pod ko-



niec embriogenezy [97, 119]. Badane dotychczas gatunki i odmiany posiadały wysoką zawartość glukozynolanów. Wykazanie obecności komórek myrozynazowych u odmiany „OO” Bolko pozwala sądzić, iż ich występowanie jest cechą charakterystyczną dla tej rodziny i nie zależy od poziomu glukozynolanów.

Komórki myrozynazowe badanych odmian rzepaku, podobnie jak u innych przedstawicieli rodziny Brassicaceae, zlokalizowane były wśród powierzchniowych warstw komórek kory pierwotnej korzeni zarodkowych lub parenchymy liścieni. Podobnie idioblasty nowego typu, stwierdzone w słupekach i bardzo młodych łuszczykach, zlokalizowane były tuż pod skórką. Związane jest to z obronną rolą systemu myrozynaza - glukozynolany [116]. Potwierdza to również obecność myrozynazy w cytoplazmie komórek szparkowych i ksylemie, które jako pierwsze są atakowane przez patogeny [43]. Odpowiedzią rośliny na uszkodzenie komórek (np. przez owady lub inne szkodniki) może być wzrost poziomu glukozynolanów, zwłaszcza indolowych [24, 65].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dostarczają nowych danych o korelacjach między glukozynolanami, myrozynazą wywołującą ich rozpad i komórkami zawierającymi ten enzym. Wykazano, iż metabolizm glukozynolanów jest ściśle związany z morfogenezą rzepaku *in vitro* i *in vivo* oraz, że dużą rolę w jego regulacji odgrywają czynniki endo- i egzogenne. Prekursory glukozynolanów, jak i niektóre produkty ich hydrolizy mogą być strukturalnymi i energetycznymi związkami wykorzystywanymi w procesie wzrostu i różnicowania izolowanych łuszczych. Stosunek glukozynolanów indolowych do całkowitej zawartości glukozynolanów w izolowanych łuszczykach odmiany Bolko był znacznie niższy niż w łuszczykach *in situ*. U tej odmiany, podobnie jak u odmiany Jet Neuf, stwierdzono obecność nowego typu komórek zawierających myrozynazę, jak i typowych komórek myrozynazowych. Wysoka aktywność myrozynazy w nasionach wskazuje, iż synteza glukozynolanów podlega ciągłej regulacji na zasadzie sprzężenia zwrotnego (również przez enzymy hydrolityczne), w wyniku której determinowana jest ostateczna zawartość tych metabolitów.

## 6. WNIOSKI

1. Wyższy potencjał morfogenetyczny liścieni rzepaku odmiany wysokoglukozynolanowej (Jet Neuf), niż podwójnie ulepszonych (Bolko i Jantar), wskazuje na korelacje między fizjologicznymi i biochemicznymi procesami prowadzącymi do różnicowania a katabolizmem glukozynolanów.

2. Rozwój izolowanych łuszczyń rzepaku w kulturach *in vitro* i dojrzewanie w nich nasion zależy od współdziałania czynników endo- i egzogennych. Najważniejszym z nich jest faza rozwojowa izolowanej łuszczyzny, drugorzędnymi - lecz równie ważnymi - regulatory wzrostu i stopień zestalenia pożywki.

3. Duża zdolność do regeneracji eksplantatów rzepaku, różnice w aktywności myrozynazy oraz w poziomie glukozynolanów w łuszczyznach hodowanych *in vitro* i pochodzących z roślin uprawianych w polu sugerują, iż metoda kultur *in vitro* może być wykorzystana w badaniach nad metabolizmem glukozynolanów. Kultury *in vitro* łuszczyń rzepaku mogą być ponadto przydatne w badaniach wpływu czynników endo- i egzogennych na regulację rozwoju nasion, ich dojrzewanie i skład chemiczny bez interakcji z całą rośliną.

4. W trakcie dojrzewania nasion w kulturach *in vitro* łuszczyń zachodzi katabolizm glukozynolanów, któremu towarzyszy obniżenie aktywności myrozynazy. Można przypuszczać, że zarówno prekursorzy glukozynolanów alkenylowych (metionina), jak i indolowych (tryptofan) oraz niektóre produkty hydrolizy glukozynolanów (siarka i glukoza) spełniają funkcję fizjologiczną w regulacji wzrostu, jako budulcowe i energetyczne związki wykorzystywane przez rozwijające się nasiona.

5. Skorelowana dodatkowo ze zmianami w poziomie glukozynolanów aktywność myrozynazy wskazuje na związek między zawartością glukozynolanów a aktywnością enzymatyczną w organach, w których zachodzi zarówno synteza (nasiona dojrzewające w łuszczyznach *in situ*), jak i katabolizm glukozynolanów (liścienie, łuszczyzny dojrzewające *in vitro*).

6. Obecność komórek myrozynazowych w nasionach rzepaku warunkuje wysoka aktywność myrozynazy, która nie zależy od poziomu glukozynolanów. W tkankach pochodzenia generatywnego (łuszczyzny) po raz pierwszy stwierdzono występowanie nowego typu idioblastów białkowych. Wstępne badania pozwalają przypuszczać, iż komórki te są również miejscem lokalizacji myrozynazy. Znaczenie nowego typu idioblastów w metabolizmie glukozynolanów pozostaje do wyjaśnienia.

## LITERATURA

- [1] Afzalpurkar A.B., 1974: Tissue cultures of rapeseed, glucosinolates and fatty acid composition. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 76, 550-552
- [2] Bajaj Y.P.S., Mahajan S.K., Labana K.S., 1986: Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. juncea*, through ovary, ovule and embryo culture. *Euphytica*, 35, 103-109
- [3] Barratt D.H.P., 1986: In vitro pod culture of *Pisum sativum*. *Plant Sci.*, 43, 223-228
- [4] Barsby T.L., Yarrow S.A., Shepard J.F., 1986: A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.*, 5, 101-103
- [5] Bartkowiak-Broda I., Krzymański J., 1981: Zmiany w składzie chemicznym nasion ozimego rzepaku bezerukowego K-2040 w czasie formowania i dojrzewania. *Biuletyn IHAR*, 146, 25-33
- [6] Basu A., Sethi U., Guha-Mukherjee S., 1989: Regulation of cell proliferation and morphogenesis by amino acids in *Brassica* tissue cultures and its correlation with treonine deaminase. *Plant Cell Rep.*, 8, 333-335
- [7] Bjerg B., Kachlicki P.W., Larsen L.M., Sorensen H.S., 1987: Metabolism of glucosinolates. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań*, 496-506
- [8] Bones A.M., 1990: Distribution of  $\beta$ -thioglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerant plants of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.*, 41, 737-744
- [9] Bones A.M., Iversen T.H., 1985: Myrosin cells and myrosinase. *Isr. J. Bot.*, 34, 351-376
- [10] Bones A.M., Slupphaug G., 1989: Purification, characterization and partial amino acid sequencing of  $\beta$ -thioglucosidase from *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.*, 134, 722-729
- [11] Booth E.J., Walker K.C., 1990: Effect of harvest date and pod position on glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 53, 43-61
- [12] Brar G., Thies W., 1977: Contribution of leaves, stem, siliques and seeds to dry matter accumulation in ripening seeds of rapeseed, *Brassica napus* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 82, 1-13
- [13] Brenner M.L., 1987: The role of hormones in photosynthetic partitioning and seed filling. W: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Wyd. Davies P.J., Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, 474-493

- [14] Byczyńska B., Krzymański J., 1981: Materiały hodowlane rzepaku ozimego o zmienionym składzie glukozynolanów. Biuletyn IHAR, 146, 63-64
- [15] Byczyńska B., Krzymański J., Wiążecka K., 1970: Zawartość izotiocyjanianów i oksazolidyntyonów w nasionach rzepaku ozimego w czasie ich formowania i dojrzewania. Hodowla Roślin, Aklim. Nasien., 14, 547-551
- [16] Chang S.F., Yie S.T., 1979: Regeneration of plantlets in vitro from different parts of rape plants. Proc. Natl. Sci. Coun. ROC, 3, 273-278
- [17] Chew F.S., 1988: Biological effects of glucosinolates. W: Biologically Active Natural Products. Wyd. Cutler H.G., Am. Chem. Soc., Washington, 155-181
- [18] Choesin D.N., Boerner R.E.J., 1991: Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae). Am. J. Bot., 78, 1083-1090
- [19] Chuong P.V., Beversdorf W.D., 1985: High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Sci., 39, 219-226
- [20] Crouch M.L., Sussex I.M., 1981: Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. Planta, 153, 64-74
- [21] Dale A., 1987: Canola - the universal oilseed. Proc. 7th Int. Rape-seed Congress, Poznań, 708-712
- [22] De Bouille P., Sotta B., Miginiac E., Merrien A., 1989: Hormones and pod development in oilseed rape (*Brassica napus*). Plant Physiol., 90, 876-880
- [23] De March G., Mc Gregor D.I., Seguin-Swartz G., 1989: Glucosinolate content of maturing pods and seeds of high and low glucosinolate summer rape. Can. J. Plant Sci., 69, 929-932
- [24] Doughty K.J., Porter A.J.R., Morton A.M., Kiddle G., Bock C.H., Wallis-grove R., 1991: Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. II. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. Ann. Appl. Biol., 118, 469-477
- [25] Drozdowska L., Rogozińska J., 1981: Wpływ światła i siarki na metabolizm glukozynolanów w siewkach rzepaku. Biuletyn IHAR, 146, 135-141
- [26] Drozdowska L., Rogozińska J., 1982: The occurrence of glucosinolates during the flowering and maturation of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Acta Agrobot., 35, 25-29
- [27] Drozdowska L., Thangstad O.P., Beisvag T., Evien K., Iversen T.H., 1991: Myrosinase and myrosin cell development during embryogenesis and seed maturation. XVI Congress of Scand. Soc. for Plant Physiol., Ulvik, Norway, 1991. Abstracts: Physiol. Plant, 82, 26

- [28] Drozdowska L., Ulanowska M., Rogozińska J., 1992: The effect of endo- and exogenous factors on growth and maturation of oilseed rape siliques cultured in vitro. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 61, w druku
- [29] Dunwell J.M., 1981: In vitro regeneration from excised leaf discs of three Brassica species. *J. Exp. Bot.*, 32, 789-799
- [30] Dunwell J.M., Cornish M., De Courcel A.G.L., Middlefell-Williams J.E., 1983: Induction and growth of microspore derived embryos of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *J. Exp. Bot.*, 34, 1768-1778
- [31] Evans A.S., 1991: Whole plant responses of *Brassica campestris* (Cruciferae) to altered sink-source relations. *Am. J. Bot.*, 78, 394-400
- [32] Fazekas G.A., Sedmach P.A., Palmer M.V., 1986: Genetic and environmental effects on in vitro shoot regeneration from cotyledon explants of *B. juncea*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 6, 177-180
- [33] Feeny P., Rosenberry L., 1982: Seasonal variation in the glucosinolate content of North American *B. nigra* and *Dentaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 10, 23-32
- [34] Finkelstein R.R., Tenberge K.M., Shumway J.E., Crouch M.L., 1985: Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol.*, 78, 630-636
- [35] Gijzen M., Kao H.M., McGregor D.I., Seguin-Swartz G., 1987: Glucosinolates in a cell suspension culture of *B. juncea* (L.) COSS. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań*, 521-525
- [36] Gijzen M., McGregor D.I., Seguin-Swartz G., 1989: Glucosinolate uptake by developing rapeseed embryos. *Plant. Physiol.*, 89, 260-263
- [37] Glendening T.M., Poulton J.E., 1988: Glucosinolate biosynthesis, sulfation of desulfobenzylglucosinolate by cell-free extracts of cress (*Lepidium sativum*) seedlings. *Plant Physiol.*, 86, 319-321
- [38] Glimelius K., Fahleson J., Landgren M., Sjodin C., Sundberg E., 1990: Improvements of the Brassica crops by transfer of genes from alien species via somatic hybridization. *Proc. 7th Int. Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam*, 299-304
- [39] Grabiec B., Krzymański J., 1986: Genealogia rzepaku ozimego, podwójnie ulepszanego w Polsce. *Wyniki badań nad rzepakiem ozimym*, 1985, IHAR, 21-43
- [40] Grob K., Matile P., 1979: Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Sci. Lett.*, 14, 327-335
- [41] Grootwassink J.W.D., Kolenovsky A.D., Balesvich J.J., Jain J.C., Underhill E.W., 1990: Conversion of glucosinolate synthetic precursors in Brassica cultures. *Proc. 7th Int. Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam*, 667-672

- [42] Hoefert L.L., Martin S.S., 1980: Ultrastructure of protein-accumulating cells (idioblasts) in *Thlaspi arvense*. Bot. Soc. Am. Mis. Ser. Publ., 158, 52
- [43] Höglund A.-S., Lenman M., Falk A., Rask L., 1991: Distribution of myrosinase in rapeseed tissues. Plant Physiol., 95, 213-221
- [44] Inanaga S., Kumura A., Murata Y., 1979: Photosynthesis and yield of rapeseed. JARQ, 13, 169-173
- [45] Inanaga S., Kumura A., 1987: Internal factors affecting seed set of rapeseed. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 612-617
- [46] Iori R., Fontana F., Palmieri S., 1987: Total glucosinolates, glucose and myrosinase activity during rapeseed ripening (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 639-644
- [47] Iversen T.H., Baggerud C., Beisvag T., 1979: Myrosin cells in Brassicaceae roots. Z. Pflanzenphysiol., 94, 143-154
- [48] Iversen T.H., Baggerud C., 1980: Myrosinase activity in differentiated and undifferentiated plants of Brassicaceae. Z. Pflanzenphysiol., 112, 391-401
- [49] Jabłoński M., Horodyski A., 1981: Omówienie niektórych prac nad technologią uprawy rzepaku ozimego. Biuletyn IHAR, 146, 57-64
- [50] Jain J.C., Michayluk M.R., Grootwassink J.W.D., Underhill E.W., 1989: Distribution of enzymes catalyzing the glucosylation and sulfation steps of glucosinolate biosynthesis in *B. juncea* seedlings and cultured cells. Plant Sci., 64, 25-29
- [51] Jain R.K., Chowdhury J.B., Sharma D.R., Friedt W., 1988: Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 14, 197-206
- [52] James D.C., Rossiter J.T., 1991: Development and characteristics of myrosinase in *Brassica napus* during early seedling growth. Physiol. Plant., 82, 163-170
- [53] Jorgensen L.B., 1981: Myrosin cells and dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in the order Capparales. Nord. J. Bot., 1, 433-445
- [54] Josefsson E., 1970: Pattern, content and biosynthesis of glucosinolates in some cultivated Cruciferae. Thesis. University of Lund, Lund, Sweden, 1-42
- [55] Josefsson E., 1973: Studies of the biochemical background to differences in glucosinolate content in *Brassica napus* L. III. Further studies to localize metabolic blocks. Physiol. Plant., 29, 28-32
- [56] Kachlicki P., 1989: Analiza zawartości glukozynolanów w zielonych częściach roślin oraz w korzeniach rzepaku. Rośliny Oleiste - Wyniki Badań 1988, IHAR, 50-62

- [57] Kachlicki P., 1990: Glukozyzyny i inne związki niskocząsteczkowe specyficzne dla rodzaju *Brassica*. Występowanie, właściwości i rola w metabolizmie roślin. *Rośliny Oleiste - Wyniki Badań 1989*, IHAR, 65-74
- [58] Kachlicki P., Mendelewski P., 1987: Rapeseed myrosinase isoenzymes studies using isoelectric focusing on ultra thin gels. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 1503-1508*
- [59] Kartha K.K., Gamburg O.L., Constabel F., 1974: In vitro plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* cv. Zephyr). *Physiol. Plant.*, 31, 217-220
- [60] Kaur S., Gupta S.K., Sukhija P.S., Munshi S.K., 1990: Accumulation of glucosinolates in developing mustard (*Brassica juncea* L.) seeds in response to sulphur application. *Plant Sci.*, 66, 181-184
- [61] Klimaszewska K., Keller W.A., 1985: High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 4, 183-197
- [62] Klimaszewska K., Keller W.A., 1988: Regeneration and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Diplotaxis harra*. *Plant Sci.*, 58, 211-222
- [63] Kohlenbach H.W., Wenzel G., Hoffmann F., 1981: Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 131-142
- [64] Kozłowska H.J., Nowak H., Nowak J., 1983: Characterization of myrosinase in Polish varieties of rapeseed. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 1171-1178
- [65] Koritsas V.M., Lewis J.A., Fenwick G.R., 1991: Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). *Ann. Appl. Biol.*, 118, 209-221
- [66] Kranz E., 1988: Somatic embryogenesis in stationary phase suspension cultures derived from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus* L. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 12, 141-146
- [67] Kräling K., Röbelen G., Thies W., Herrmann M., Ahmadi M.R., 1990: Variation of seed glucosinolates in lines of *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 105, 33-39
- [68] Krzymański J., 1970: Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin, Aklim. Nasien.*, 14, 95-133
- [69] Krzymański J., 1981: Prace nad rzepakiem ozimym o ulepszonym składzie chemicznym - lata 1976-1980. *Biuletyn IHAR*, 146, 3-15
- [70] Krzymański J., Bartkowiak-Broda I., Krótka K., 1987: Recent achievements in breeding work on winter rape (*Brassica napus* L.) in Poland. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 40-48*

- [71] Larsen P.O., 1981: Glucosinolates. W: The Biochemistry of Plants. Wyd. Stumpf P.K., Conn E.E., Academic Press, New York, 502-525
- [72] Lazzeri P.A., Dunwell J.M., 1984: In vitro shoot regeneration from seedling root segments of Brassica oleracea and Brassica napus cultivars. Ann. Bot., 54, 341-350
- [73] Li L.C., Kohlenbach H.W., 1982: Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplasts of Brassica napus L. Plant Cell Rep., 1, 209-211
- [74] Lonnerdal B., Janson J.C., 1973: Studies on myrosinase. II. Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed. Biochim. Biophys. Acta, 315, 421-429
- [75] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951: Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 255-275
- [76] Lu D.Y., Pental D., Cocking E.C., 1982: Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. Z. Pflanzenphysiol., 107, 59-63
- [77] Luckner M., 1980: Expression and control of secondary metabolism. W: Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products. Wyd. Bell E.A., Charlwood B.V., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg - New York, 8, 23-91
- [78] Mc Dannell R., Mc Lean A.E.M., Hanley A.B., Heaney R.K., Fenwick G.R.; 1988: Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins). A Review Food Chem. Toxic., 26, 59-70
- [79] McGregor D.I., 1988: Glucosinolate content of developing rapeseed (Brassica napus L. „Midas”) seedlings. Can. J. Plant Sci., 68, 367-380
- [80] Meakin P.J., Roberts J.A., 1990: Dehiscence of fruit in oilseed rape (Brassica napus L.). The role of cell wall degrading enzymes and ethylene. J. Exp. Bot., 41, 1003-1011
- [81] Mercer E.H., Birbeck M.S.C., 1970: Mikroskopia elektronowa. PWN, Warszawa
- [82] Morgan D.G., 1980: Factors affecting fruit and seed development in field beans and oilseed rape. Aspects and Prospects of Plant Growth Regulators. Monograph, 6, 151-164
- [83] Murashige T., Skoog F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497
- [84] Murata M., Orton T.J., 1987: Callus initiation and regeneration capacities in Brassica species. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 11, 111-123
- [85] Murphy D.J., Cummins I., 1989: Biosynthesis of seed storage products during embryogenesis in rapeseed, Brassica napus L. J. Plant Physiol., 135, 63-69



- [86] Nałęczynska A., Cegielska T., 1985: Androgeniza i otrzymywanie haploidalnych roślin rzepaku (*Brassica napus*). Biul. Hod. Aklim. Roślin, 157, 147-151
- [87] Nałęczynska A., Krzymański J., 1987: Regeneration and ploidy level of plants from anther culture of winter rapeseed. Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 103-106
- [88] Norton G., Harris J.F., 1975: Compositional changes in developing rapeseed (*Brassica napus* L.). Planta, 123, 163-174
- [89] Obendorf R.L., Rytko G.T., Byrne M.C., 1983: Soya bean seed growth and maturation by in vitro pod culture. Ann. Bot., 51, 217-227
- [90] Palmer M.Y., Yeung S.P., Sang J.P., 1987: Glucosinolate content of seedlings tissue cultures and regenerant plants of *Brassica juncea*. J. Agric. Food Chem., 35, 262-265
- [91] Palmieri S., Iori R., Leoni O., 1986: Myrosinase from *Sinapis alba* L.: A new method of purification for glucosinolate analyses. J. Agric. Food Chem., 34, 138-140
- [92] Pechan P.M., 1988: Ovule fertilization and seed number per pod determination in oilseed rape (*Brassica napus*). Ann. Bot., 61, 201-207
- [93] Pihakaski K., Pihakaski S., 1978: Myrosinase in Brassicaceae. II. Myrosinase activity in different organs of *Sinapis alba* L. J. Exp. Bot., 29, 335-345
- [94] Popławska W., 1988: Cytogenetyka rzepaku i innych roślin z rodzaju *Brassica*, męska sterylność u rzepaku. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1987, IHAR, 19-32
- [95] Pszczoła J., Grabiec B., 1989: Nowa polska odmiana rzepaku podwójnie ulepszonego. Rośliny Oleiste - Wyniki Badań 1988, IHAR, 7-13
- [96] Qinzhen Z., Haifu X., Xiafua L., Xuequn Z., Yinhua L., 1991: Changes in content of glucosinolates and its accumulation in silique and seeds of oilrape (*Brassica napus* L.). J. Agron. Crop Sci., 166, 152-156
- [97] Rest J.A., Vaughan J.G., 1972: The development of protein and oil bodies in the seed of *Sinapis alba* L. Planta, 105, 245-262
- [98] Rodkiewicz B., 1973: Embriologia roślin kwiatowych. PWN, Warszawa, 227-229
- [99] Rogozińska J., Drozdowska L., 1980: Organogenesis and plant formation from cotyledon and callus culture of rape. Acta Soc. Bot. Pol., 49, 5-20
- [100] Rogozińska J., Drozdowska L., 1981: Glucosinolates in embryo, cotyledon and callus cultures of rape depending on external factors. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 83, 439-442

- [101] Rogozińska J., Sznajderowska M., Drozdowska L., 1987: Factors affecting morphogenetic potential in oilseed rape roots of the Skrzyszowicki and Start cultivars. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 56, 315-324
- [102] Rogozińska J., Drozdowska L., 1988: Kultury in vitro rzepaku i ich zastosowanie w badaniach nad metabolizmem glukozynolanów. *Postępy Nauk Rolniczych*, 1-2, 39-46
- [103] Sang J.P., Minchinton J.R., Johnstone P.K., Truscott R.J.W., 1984: Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can. J. Plant Sci.*, 64, 77-93
- [104] Saxena P.K., Williams D., King J., 1990: The selection of chlor-sulfuron-resistant cell lines of independent origin from an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* L. *Plant Sci.*, 59, 231-237
- [105] Schnug E., 1990: Glucosinolates - fundamental, environmental and agricultural aspects. W: *Sulphur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants*. Wyd. *Rennenberg i in.*, SPB Acad. Publ., The Hague, 97-106
- [106] Schnug E., Ceynowa J., 1990: Phytopathological aspects of glucosinolates in oilseed rape. *J. Agron. Crop Sci.*, 165, 319-328
- [107] Schroeder H.E., 1984: Effects of applied growth regulators on pod growth and seed protein composition in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.*, 35, 813-821
- [108] Sharma K.K., Bhojwani S.S., 1990: Histological aspects of in vitro root and shoot differentiation from cotyledon explants of *Brassica juncea* L. *Plant Sci.*, 69, 207-214
- [109] Sharma K.K., Bhojwani S.S., Thorpe T.T., 1991: The role of cotyledonary tissue in the differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 24, 55-59
- [110] Shu W., Loh C.S., 1987: Secondary embryogenesis in long-term cultures of winter oilseed rape, *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *New Phytologist*, 107, 39-46
- [111] Sones K., Heaney R.K., Fenwick G.R., 1984: An estimate of the mean daily intake of glucosinolates from cruciferous vegetables in the UK. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 712-720
- [112] Srivastava P.S., Varga A., Bruinsma J., 1980: Growth in vitro of fertilized ovules of pea, *Pisum sativum* L., with and without pods. *Z. Pflanzenphysiol.*, 98, 347-354
- [113] Stringam G.R., 1977: Regeneration in stem explants of haploid rape-seed. *Plant Sci. Lett.*, 9, 115-119

- [114] Sundberg E., Glimelius K., 1986: A method for production of inter-specific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci.*, 43, 155-162
- [115] Swanson E.B., Coumans M.P., Brown G.L., Patel J.D., Beversdorf W.D., 1988: The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after in vitro selection of microspores and protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 7, 83-87
- [116] Thangstad O.P., Iversen T.H., Slupphaug G., Bones A., 1990: Immunocytochemical localization of myrosinase in *Brassica napus* L. *Planta*, 180, 245-248
- [117] Thomas E., Wenzel G., 1975: Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzuchtg.*, 74, 77-81
- [118] Toriyama K., Hinata K., Kameya T., 1987: Production of somatic hybrid plants, „*Brassicomorica*ndia", through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci.*, 48, 123-128
- [119] Tykarska T., 1987: Rape embryogenesis. VI. Formation of protein bodies. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 56, 585-597
- [120] Underhill E.W., 1980: Glucosinolates. W: *Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products*. Wyd. Bell E.A., Charlwood B.V., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 8, 493-511
- [121] Van Staden J., 1983: Seeds and cytokinins. *Physiol Plant.*, 58, 340-346
- [122] Wang J.W., Sorensen E.L., Liang G.H., 1984: In vitro culture of pods from annual and perennial *Medicago* species. *Plant Cell Rep.*, 3, 146-148
- [123] Werker E., Vaughan J.G., 1974: Anatomical and ultrastructural changes in aleurone and myrosin cells of *Sinapis alba* during germination. *Planta*, 226, 243-255
- [124] Werker E., Vaughan J.G., 1976: Ontogeny and distribution of myrosin cells in the shoot of *Sinapis alba*. A light and electron-microscope study. *Isr. J. Bot.*, 25, 140-151
- [125] Wojciechowski A., Niedziela A., 1988: Zmienność szeregu cech i właściwości mieszańców  $F_1$  - syntetyczne rody rzepaku x jedno- i dwuzerowe odmiany hodowlane. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1987, IHAR, 201-211
- [126] Xu Z.H., Davey M.R., Cocking F.C., 1980: Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Sci. Lett.*, 24, 117-121
- [127] Yiu S.H., Collins F.W., Fulcher R.G., Altosaar I., 1984: Chromatographic and microscopic detection of glucosinolates in rapeseed using N,2,6-trichloro-p-benzoquinoneimine. *Can. J. Plant Sci.*, 64, 869-878

GLUKOZYNOLANY I ICH METABOLIZM U RZEPAKU  
W KULTURACH IN VITRO I IN VIVO

Streszczenie

Określono zdolności regeneracyjne liścieni, wierzchołków pędów siewek i łuszczyń odmian rzepaku różniących się poziomem glukozyolanów. W różniących się eksplantatach siewek oraz dojrzewających in vitro łuszczyń analizowano czynniki wpływające na metabolizm glukozyolanów i korelacje między glukozyolanami a rozkładającym je enzymem - myrozynazą. Badania nad metabolizmem glukozyolanów w kulturach in vitro uzupełniono badaniami na rzepaku uprawianym w warunkach polowych.

Wykazano, iż wyższy potencjał morfogenetyczny posiadały liścienie rzepaku odmiany wysokoglukozyolanowej (Jet Neuf) niż odmian podwójnie ulepszonych (Bolko i Jantar). Duża zdolność do organogenezy izolowanych liścieni i wierzchołków pędów siewek skorelowana była z zachodzącym w nich katabolizmem glukozyolanów. Czynniki, które wpływały na morfogenezę izolowanych eksplantatów (odmiana, regulatory wzrostu) wpływały również na aktywność myrozynazy. Organogeneza liścieni i wierzchołków pędów związana była ze wzrostem aktywności myrozynazy.

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na wzrost łuszczyń w kulturach in vitro i dojrzewanie w nich nasion była faza rozwojowa łuszczyń. Drugorzędnymi, lecz niemniej ważnymi czynnikami były regulatory wzrostu i stopień zestalenia pożywki. Wykazano, iż najwięcej nasion dojrzewało w łuszczyńach inkubowanych na pożywkę zestaloną, zawierającą ABA.

Aktywność myrozynazy w izolowanych łuszczyńach zależała od odmiany, regulatorów wzrostu i stężenia agaru w pożywce oraz od poziomu glukozyolanów. Podwyższenie poziomu glukozyolanów w łuszczyńach w okresie organogenezy skorelowane było ze wzrostem aktywności myrozynazy. Dalszemu dojrzewaniu izolowanych łuszczyń rzepaku in vitro towarzyszył katabolizm glukozyolanów. Wraz z utratą zdolności łuszczyń do syntezy glukozyolanów aktywność enzymatyczna ulegała obniżeniu.

Odbiciem różnic odmianowych w poziomie glukozyolanów w nasionach były różnice w zawartości tych związków w izolowanych łuszczyńach. Dominującym glukozyolanem w kulturach in vitro łuszczyń odmiany Jet Neuf była progointryna, która podobnie jak pozostałe badane glukozyolany alkenylowe i indolowe występowała w znacznie mniejszych ilościach niż w łuszczyńach in situ. W izolowanych łuszczyńach rzepaku odmiany Bolko była ona jedynym glukozyolanem alkenylowym. Ze względu na bardzo niską zawartość glukozyolanów indolowych w łuszczyńach odmiany podwójnie ulepszonej, stosunek tej grupy glukozyolanów do całkowitej puli glukozyolanów był również znacznie niższy niż in situ i wynosił - jak obliczono - 10 %.

W roślinach rzepaku uprawianych w polu, przekształcenie słupka w owoc i wstępne etapy formowania zarodka związane były z obniżeniem poziomu glukozyolanów i aktywności myrozynazy. Synteza glukozyolanów rozpoczynała się w łuszczyńach, w których znajdowały się zarodki w stadium torpedy.

W kolejnych etapach dojrzewania nasion zachodził w nich dalszy wzrost całkowitego poziomu glukozynolanów i aktywności myrozynazy, ujemnie skorelowany ze zmianami w tkankach łuszczyń. W zielonych nasionach rzepaku odmiany Jet Neuf obecne były wszystkie glukozynolany występujące w nasionach dojrzałych. W największej ilości występowała progoitryna, w następnej kolejności kształtowały się poziomy glukonapiny, glukobrassikanapiny i napoleiferyny. Dojrzewanie nasion odmiany Bolko było głównie związane z obniżeniem zawartości progoitryny i wzrostem poziomu hydroksyglukobrassicyny - glukozynolanu indolowego.

Wysoka aktywność myrozynazy w nasionach skorelowana była z występowaniem komórek myrozynazowych. W słupkach i młodych łuszczykach stwierdzono obecność nowego typu idioblastów, które nie były typowymi komórkami myrozynazowymi, lecz prawdopodobnie zawierały myrozynazę. Obecność obu typów komórek u odmiany rzepaku Jet Neuf („O”) i Bolko („OO”) wskazuje, iż ich występowanie jest cechą gatunkową i nie zależy od zawartości glukozynolanów w nasionach.

GLUCOSINOLATES AND THEIR METABOLISM IN OILSEED RAPE  
IN IN VITRO CULTURE AND IN VIVO

Summary

Regenerative abilities of cotyledons, tips of seedlings shoots and siliques of oilseed rape varieties differing in glucosinolate content were determined. In differentiating seedling explants and in maturing in vitro siliques, factors affecting the glucosinolate metabolism, and correlation between glucosinolate content and the glucosinolate hydrolysing enzyme - myrosinase were studied. The investigations of the glucosinolate metabolism in in vitro culture were supplemented with studies on oilseed rape cultivated under field conditions.

It was found that cotyledons of a high-glucosinolate oilseed rape variety (Jet Neuf) demonstrated higher morphogenetic potential than that of double improved varieties (Bolko and Jantar). High ability of isolated cotyledons and tips of seedling shoots to organogenesis was correlated with glucosinolate catabolism, undergoing in them. The factors (variety, growth regulators) which affected morphogenesis of isolated explants disclosed also an effect on myrosinase activity. Organogenesis of cotyledons and tips of shoots was linked with increase of myrosinase activity.

The developmental stage of isolated silique was the most important factor affecting the growth of siliques in in vitro culture and the maturation of the seeds in them. Secondary importance factor were the growth regulators and degree of solidification of the medium. It was found that the highest number of seeds was matured in siliques incubated on solidified medium containing ABA.

Myrosinase activity in isolated siliques depended on variety, growth regulators, concentration of agar in the medium and on the glucosinolate content. Higher level of glucosinolates in siliques during embryogenesis was correlated with myrosinase activity. Further maturation in vitro of isolated oilseed rape siliques was accompanied by glucosinolate catabolism. Enzymatic activity decreased together with the loss of the ability of siliques to synthesize glucosinolates.

Differences in glucosinolate content in isolated siliques reflected the specific differences in glucosinolate level in the seeds. Progoitrin was the dominant glucosinolate in siliques of the variety Jet Neuf cultured in vitro, which, similar to other alkenyl and indole glucosinolates studied, occurred in much smaller amounts than in the siliques in situ. In isolated siliques of the Bolko variety, it was the only alkenyl glucosinolate. Because of very low indole glucosinolate content in the siliques of the double improved variety, the ratio of this glucosinolate group to the total glucosinolate pool was also much smaller than in situ, and it amounted to 10 %.

Transformation of the pistil to the fruit and preliminary steps of the embryo formation in oilseed rape plants grown in the field were connected

with a decrease of glucosinolate level and myrosinase activity. The synthesis of glucosinolates were begun in the siliques which had embryo in the torpedo stage. During next step of the seeds ripening, further increase of the total glucosinolate level and myrosinase activity was observed. It was negatively correlated with changes in the silique tissues. All the glucosinolates present in ripe seeds of the Jet Neuf variety occurred also in the corresponding green seeds. Progoitrin was found in the higher amounts, next were concentrations of gluconapin, glucobrassicinapin and napoleiferin. Ripeness the seeds of the Bolko variety was linked predominantly with a decrease of progoitrin content and an increase of concentration of an indole glucosinolate - hydroxyglucobrassicin.

High myrosinase activity in the seeds was correlated with the existence of myrosin cells. A new type of idioblasts was discovered on the pistils and young siliques. They were not typical myrosin cells, but probably contained myrosinase. The presence of both types of cells in oilseed rape varieties Jet Neuf and Bolko suggests that their occurrence is a special property and it does not depend on the glucosinolate content in the seeds.

**Biblioteka Główna ATR  
w Bydgoszczy**

**76707**

**ISSN 0209-0597**