

## PORÓWNANIE DWÓCH METOD DIPLOIDYZACJI HAPLOIDALNYCH ROŚLIN CEBULI

*Adela Adamus, Ewa Grzebelus, Barbara Michalik*

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Cebula, roślina warzywna o dużym znaczeniu gospodarczym, jest gatunkiem obligatoryjnie dwuletnim. Z tego względu otrzymanie nowej odmiany jest długotrwałe. Czas ten można skrócić przez wykorzystanie linii podwojonych haploidów (DH), które mogą zastąpić pokolenia wsobne.

Badania prowadzone w Katedrze Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa w latach 1995–2000 były głównie skupione wokół czynników stymulujących proces gynogenezy u cebuli. Dotyczyły one wpływu genotypu, stadium rozwojowego wierzchnia zalążkowego, składu pożywek, warunków wzrostu roślin donorowych, temperatury prowadzenia kultur *in vitro* [ADAMUS, MICHALIK 1998; MICHALIK i in. 2000]. Poza indukcją roślin haploidalnych bardzo ważny jest proces podwojenia genomu, gdyż spontaniczna diploidyzacja u cebuli zachodzi z niską częstotliwością.

Celem niniejszej pracy było zbadanie działania związków antymitotycznych na etapie regeneracji roślin w kulturze *in vitro* lub w trakcie indukcji rozwoju haploidalnych zarodków.

### Materiał i metody

Proces podwajania genomu u haploidalnych roślin cebuli (*Allium cepa* L.) otrzymanych w wyniku indukcji gynogenezy u różnych linii hodowlanych prowadzono dwoma metodami. W pierwszej (lata 1998–1999) dodawano 10 lub 50 mg kolchicyny na 1 dm<sup>3</sup> pożywki namnażającej (M<sub>3</sub>). Z gynogenicznych, dobrze rozwiniętych roślin, podczas pasażu usuwano liście i korzenie, a pozostałe części rośliny dzielono pionowo na dwie części. Eksplantanty umieszczano na odpowiedniej pożywce na okres 72 godz. w ciemności w temperaturze 14°C lub 23°C, następnie dokładnie płukano w sterylnej wodzie i przenoszono na świeżą pożywkę M<sub>3</sub> dla stymulacji rozwoju liści i systemu korzeniowego.

W drugiej metodzie, kultury pąków kwiatowych cebuli prowadzono na pożywce indukcyjnej A<sub>1</sub> i regeneracyjnej R, do których dodawano związki antymitotyczne. Stosowano kolchicynę w ilości 50 i 250 mg lub amiprofos metylu (APM) w ilości 1,5 mg i 7,5 mg·dm<sup>-3</sup> odpowiedniej pożywki. Otrzymane zarodki pasa-

zowano na pożywkę  $M_3$ , a ploidalność zregenerowanych roślin określano cytometrem przepływowym. Składy pożywek  $A_1$ , R i  $M_3$  przedstawiono w pracach MICHALIK i in. [2000] oraz NOWAK [2001].

## Wyniki i dyskusja

Dodanie kolchicyny do pożywki namnażającej wpływało na obniżenie zdolności regeneracyjnej tkanki merystematycznej piętki cebuli (tab. 1). W ciągu dwóch lat badań spośród 389 roślin poddanych procesowi diploidyacji *in vitro* średnio tylko 33% podjęło dalszy rozwój. Nieco wyższy stopień regeneracji stwierdzono przy wyższym stężeniu kolchicyny, stosowanym w temperaturze 23°C. Tak więc obniżenie temperatury nie zmniejszało toksycznego wpływu kolchicyny na rośliny cebuli. Dodatek kolchicyny do pożywki powodował zamieranie eksplantantów lub szklistość badanych fragmentów. Bardzo rzadko z tak zmienionej tkanki udawało się zregenerować prawidłowo wykształconą roślinę.

Tabela 1; Table 1

Wpływ dodatku kolchicyny do pożywki na regenerację i podwajanie genomu haploidalnych roślin cebuli (wartości średnie z lat 1998–1999)

Effect of colchicine supplemented media on regeneration and genome duplication in onion haploid plants (mean values for 1998 and 1999)

Zawartość kolchicyny Colchicine concentration (mg·dm <sup>-3</sup> )	Temperatura Temperature	Liczba roślin w kulturach <i>in vitro</i> Number of <i>in vitro</i> plants			Liczba roślin zaaklimatyzowanych do podłoża Number of acclimatized plants					
		badanych examined	zregenerowanych regenerated		ogółem total		haploidy haploids		diploidy diploids	
			szt.; no.	szt.; no.	%	szt.; no.	%	szt.; no.	%	szt.; no.
10	14°C	91	19	21	10	11	7	70	3	30
	23°C	165	59	37	37	22	22	59	15	41
50	14°C	61	23	38	18	30	12	67	6	33
	23°C	72	28	39	24	33	6	25	18	75
Suma; Summ (Średnia); (Mean)		389	129	(33)	89	(33)	47	(53)	42	(47)

Wśród 89 roślin zaaklimatyzowanych do uprawy w glebie 47% miało podwojoną liczbę chromosomów, podczas gdy pozostałe 53% było nadal haploidami. Efektywność diploidyacji była różna w badanych kombinacjach i wahała się od 30% do 75% podwojonych haploidów. Najwięcej ich otrzymano przy dodatku 50 mg kolchicyny na cm<sup>3</sup> pożywki i prowadzeniu kultury w temperaturze 23°C.

W stosunku do wyników uprzednich prac nad indukcją gynogenezy w latach 1997–1998 stwierdzono obniżenie o połowę zdolności zarodków do rozwoju w rośliny [NOWAK 2000]. Natomiast wyższa z zastosowanych dawek kolchicyny zwiększała udział roślin diploidalnych nawet o 50%. Wśród gynogenicznej populacji liczącej 754 roślin w ubiegłych latach odsetek spontanicznych diploidów wynosił do 25% [NOWAK i in. 1999].

Tabela 2; Table 2

Wpływ substancji antymitotycznych na efektywność gynogenezy i ploidalność otrzymanych roślin  
Effect of media with antimetabolic agents on gynogenesis efficiency and ploidy of regenerated plants

Badany czynnik Treatment	Liczba pąków w kulturach No. of flower buds	Plon zarodków Embryo yield		Regenerujące zarodki Regenerating embryos		Liczba roślin i klonów Number of plants and clones								Udział diplo- idów (%) Percentage of diploids
						otrzymanych total		haploidów haploids		diploidów diploids		miksoploidów mixoploids		
		szt.; no.	%	szt.; no.	%	klony clones	rośliny plants	klony clones	rośliny plants	klony clones	rośliny plants	klony clones	rośliny plants	
Kontrola; Control (A1/R)	525	20	3,8	9	45,0	9	16	8	14	1	2	0	0	12,5
A1 + 50 K/R	525	13	2,5	5	38,5	5	6	5	6	0	0	0	0	0
A1/R + 50 K	475	20	4,2	9	45,0	9	23	6	10	1	1	2	12	4,3
A1 + 250 K/R	475	2	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1/R + 250 K	600	20	3,3	1	5,0	1	2	0	0	0	0	1	2	50,0
A1 + 1,5 APM/R	569	41	7,2	18	43,9	18	25	8	25	0	0	0	0	0
A1/R + 1,5 APM	550	35	6,4	11	31,4	11	19	10	11	1	8	0	0	42,1
A1 + 7,5 APM/R	342	4	1,2	2	50,0	2	4	1	2	1	2	0	0	50,0
A1/R + 7,5 APM	425	22	5,2	8	36,4	8	9	8	9	0	0	0	0	0
Ogółem; Total	4486	177	3,9	62	35,6	63	104	56	77	4	13	3	14	12,5

A1 – pożywka indukcyjna; induction medium

R – pożywka regeneracyjna; regeneration medium

50 K, 250 K – stężenie kolchicyny ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ); concentration of colchicine ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ )

1,5 APM, 7,5 APM – stężenie amiprofosu metylu ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ); concentration of amiprofos methyl ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ )

Druga badana metoda diploidyzacji, przez stosowanie środków antymitycznych w trakcie całego procesu gynogenezy, okazała się mało przydatna. Efektywność tego procesu w kombinacji kontrolnej wynosiła 3,8 zarodka na 100 pąków cebuli w kulturze (tab. 2). Więcej rozwijających się zarodków stwierdzono w obecności 1,5 g APM-dm<sup>-3</sup> pożywki zarówno przy jego dodatku do pożywki indukcyjnej  $\Lambda_1$ , jak też regeneracyjnej R.

Przeciętnie co trzeci otrzymany zarodek rozwijał się dając jedną lub kilka roślin w klonie. Średni procent regeneracji wynosił 35% i był obniżony o około 20% w stosunku do wartości z poprzednich lat [NOWAK 2000].

Większość klonów (56 z 63 otrzymanych) składała się z roślin haploidalnych, 4 klony były diploidalne, a trzy klony były złożone z roślin haploidalnych i diploidalnych. Nie uzyskano więc zwiększenia udziału roślin o podwojonym genomie w otrzymanej populacji, aż 86% roślin pozostało haploidami.

W dotychczasowych badaniach nad gynogenezą u cebuli podwajanie genomu w kulturach *in vitro* uzyskiwano przez dodawanie środków antymitycznych do pożywek, na które wykładano zarodki [JAKŠE, BOHANEK 2000] lub do pożywek naninażających, na które wykładano fragmenty młodych, ukorzenionych cebulek [CAMPION i in. 1995; ADAMUS i in. 2001]. Natomiast indukcja gynogenezy w obecności środków antymitycznych w przypadku cebuli, nie była do tej pory opisana w literaturze. Pozytywne rezultaty tego typu postępowania zaobserwowano w kulturach mikrospor u *Brassica oleracea* var. *capitata*, kiedy po traktowaniu związkami antymitycznymi świeżo wyizolowanych mikrospor obserwowano zwiększenie efektywności androgenezy i ploidalności otrzymanych roślin [RUDOLF i in. 1999]. Niestety w przypadku cebuli metoda ta okazała się nieskuteczna.

## Literatura

- ADAMUS A., MICHALIK B. 1998. *Ustalenie składu pożywek i optymalnej wielkości pąków kwiatowych dla indukcji gynogenezy u cebuli (Allium cepa L.)*. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie 57(1): 37–42.
- ADAMUS A., SAMEK L., NOWAK E., MICHALIK B. 2001. *Optymalizacja metodyki indukcji gynogenezy i diploidyzacji haploidalnych roślin cebuli (Allium cepa L.)*. Folia Horticulturae 13/1A: 69–74.
- CAMPION B., PERRI E., AZZIMONTI M.T., VICINI E., SCHLAVI M. 1995. *Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (Allium cepa L.)*. Plant Breeding 114: 243–246.
- JAKŠE M., BOHANEK B. 2000. *Studies of alternative approaches for genome doubling in onion*, w: *Agriculturae and biotechnology „Biotechnological approaches for utilization of gametic cells”*. Cost Action 824, Bled, Slovenia: 101–104.
- MICHALIK B., ADAMUS A., NOWAK E. 2000. *Gynogenesis in Polish onion cultivars*. J. Plant. Physiol. 156: 211–216.
- NOWAK E., ADAMUS A., MICHALIK B. 1999. *Otrzymywanie podwojonych haploidów cebuli*. I Krajowa Konferencja „Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin”. Poznań, 18 XI 1999: 20–22.
- NOWAK E. 2000. *Gynogenic onion plants – studies on regeneration and diploidization*, w: *Agriculture and biotechnology „Biotechnological approaches for utilization of gametic cells”*. Cost Action 824, Bled, Slovenia: 95–99.

NOWAK E. 2001. *Charakterystyka gynogenicznej populacji oraz metody podwajania genomu haploidalnych roślin cebuli (Allium cepa L.)*. Maszynopis pracy doktorskiej, Akademia Rolnicza w Krakowie.

RUDOLF K., BOHANEK B., HANSEEN M. 1999. *Microspore culture of white cabbage Brassica oleracea var. capitata L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents*. Plant Breeding 118(3): 237–241.

**Słowa kluczowe:** *Allium cepa*, gynogeneza, podwajanie chromosomów, kolchicyna, amiprofos metylu

### Streszczenie

Otrzymanie w procesie gynogenezy regeneranty cebuli są w większości haploidami, gdyż spontaniczna diploidyżacja zachodzi z niską częstotliwością. Z tego względu opracowanie skutecznej metody diploidyżacji jest ważnym zagadnieniem, do tej pory jeszcze nierozwiązanym.

Z dwóch zastosowanych w kulturach *in vitro* metod diploidyżacji lepszą okazało się umieszczanie fragmentów młodych roślin cebuli zawierających piątkę na 72 godz. w pożywce z kolchicyną ( $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), a następnie ich przenoszenie na pożywkę stymulującą dalszy rozwój roślin. Taki sposób traktowania zwiększał odsetek roślin o podwojonym genie, ale równocześnie obniżał zdolność regeneracji eksplantatów.

Dodatek środków antymitotycznych do pożywek inicjującej  $A_1$  i regeneracyjnej R, stosowanych w procesie gynogenezy, nie zwiększał odsetka diploidalnych roślin, natomiast obniżał regenerację zarodków. Stwierdzono natomiast, że wyższe stężenie amiprofosu metylu w pożywce zwiększało efektywność gynogenezy.

## COMPARISON OF TWO CHROMOSOME DOUBLING METHODS IN HAPLOID ONION PLANTS

*Adela Adamus, Ewa Grzebelus, Barbara Michalik*

Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,  
Agricultural University, Kraków

**Key words:** *Allium cepa*, gynogenesis, chromosome doubling, colchicine, amiprofos methyl

### Summary

Plants obtained by means of gynogenesis in onion are predominantly haploids, owing to a low frequency of spontaneous chromosome doubling. Therefore the development of an efficient genome duplication method is crucial for using gynogenic onion plants in breeding practice.

Two *in vitro* diploidization methods were applied and better results were observed in explants with the basal part of stem placed for 72 hours in the me-

dium supplemented with colchicine ( $50 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) and then transferred in the colchicine-free medium to induce the plants regeneration. Such a treatment resulted in higher frequency of doubled plants but simultaneously decreased regeneration ability of the explants.

Addition of antimetabolic agents to the gynogenesis induction (A1) and regeneration (R) media did not increase the percentage of diploid plants and reduced the yield of regenerating embryos. However, higher concentration of amiprophosmethyl in the medium enhanced the efficiency of gynogenesis.

Dr hab. Adela **Adamus**  
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
al. 29 Listopada 54  
31-425 KRAKÓW