

TERESA ŁĄCZYŃSKA—HULEWICZ

HETEROZJA JAKO CZYNNIK PODNIESIENIA PLONU ZIELONKI I NASION U KONICZYNY CZERWONEJ

Podniesienie plonu zielonki u koniczyny czerwonej na drodze prostej selekcji względnie przy pomocy stosowania krzyżówek nie daje najczęściej oczekiwanego efektu. W związku z tym często spotkać się można z zarzutem, że odmiany hodowlane plonują nie lepiej niż populacje pochodzenia miejscowego. Fakt ten został już dawno stwierdzony w Szwecji, co nie neguje temu, że odmiany hodowlane mogą posiadać inne cenne właściwości, np. wybitną trwałość, odporność na mróz, różne choroby itp.

Znaczne podniesienie produktywności koniczyny można natomiast uzyskać przez zdwojenie liczby genomów, ponieważ tetraploidalna liczba chromosomów stanowi optymalny poziom dla koniczyny czerwonej. Wskazują na to wyniki doświadczeń zarówno z tetraploidalnymi odmianami typu jednokośnego, wyhodowanymi w Szwecji, jak i własną, dwukośną odmianą Wielkolistną. Bingefors i Ellerström (1) analizując plony zielonki stwierdzają, że przewaga poliploidów akcentuje się przede wszystkim w drugim roku wegetacji, przy czym wysokość tych różnic zależy w dużym stopniu od typu odmian: im forma jest późniejsza tym plon w drugim i trzecim roku wegetacji jest wyższy. I tak np. odmiana Ulva otrzymana przez zdwojenie liczby chromosomów u środkowo-szwedzkiej odmiany Ultuna, a więc formy wybitnie późnej, przewyższa w plonie zielonki odmiany diploidalne w pierwszym roku o 2—12%, a w drugim o 25—38%. Inaczej zachowuje się natomiast tetraploidalna odmiana Rea, będąca produktem zdwojenia liczby chromosomów u wcześniejszej, duńskiej odmiany o nazwie Hersnap. Najwyższa produktywność przypada u niej na pierwszy rok wegetacji.

Największe plony zielonki daje odmiana Ultuna w środkowej i północnej części kraju, a to dzięki swej wybitnej zimoodporności. Cecha ta warunkowana jest u niej przede wszystkim dużą odpornością na raka koniczynowego i nematody, a częściowo i na fuzariozę. Doskonale zimowanie tej odmiany powoduje, że różnice w plonie zielonki w dalszych latach użytkowania, w stosunku do odmian diploidalnych, są większe niż w pierwszym roku.

Zachowanie się dwukośnej odmiany Wielkolistnej jest pod pewnym

względem zbliżone do poliploidalnych odmian szwedzkich. Jako odmiana późniejsza oraz bardziej trwała i zimoodporna daje ona większe zwyczajki w plonie w drugim niż w pierwszym roku wegetacji, przy czym trwałość jej w trzecim roku może być jeszcze zupełnie zadowalająca. Mimo tych korzystnych cech, posiada ona jednak pewne wady, podobnie zresztą jak i poliploidalne odmiany szwedzkie, a to zbyt niską płodność, uniemożliwiającą w naszych warunkach otrzymanie dostatecznej ilości materiału siewnego.

Zastosowanie w hodowli koniczyny poliploidalnej zjawiska heterozji powinno w dużej mierze usunąć te braki i przyczynić się zarówno do dalszego znacznego podniesienia plonu zielonki jak i nasion. Zaznaczyć przy tym należy, że u roślin poliploidalnych efekt heterozji utrzymuje się znacznie dłużej niż u form diploidalnych, a to na skutek polimerycznego dziedziczenia cech i dłużej trwającego stanu heterozygotycznego w populacji mieszańcowej.

Trudności w podniesieniu płodności u poliploidalnej koniczyny czerwonej są niewątpliwie spowodowane zbytym zawężeniem genetycznym materiału hodowlanego, prowadzącym do coraz to ściślejszego chowu wsobnego i związanej z nim depresji w plonie i to zarówno nasion jak i zielonki.

Rozpoczęte w 1957 r. i kontynuowane do chwili obecnej badania nad stopniem samopłodności u poliploidalnej koniczyny czerwonej oraz nad wpływem chowu wsobnego na plon i żywotność roślin pozwoliły już dość dobrze na ocenę tych zjawisk w ramach posiadanego materiału hodowlanego. Chów wsobny zachodzi u koniczyny Wielkolistnej w silniejszym stopniu niż u odmian diploidalnych, a to z tego względu, że jest ona w wysokim stopniu samopłodna, w przeciwieństwie do samosterylnych form diploidalnych, u których ma miejsce jedynie chów siostrzany. Depresja jednak w plonie jest u poliploidów mimo tego niższa a to dzięki dłużej utrzymującej się heterozygotyczności populacji.

Koniczyna Wielkolistna posiada prawie 90% roślin samopłodnych, przy czym stopień samopłodności waha się od kilku do kilkudziesięciu procent, wynosząc średnio 13,0%. W specjalnie korzystnym dla osadzenia nasion roku 1963 samopłodność wynosiła od 6 do 79% (średnio 28%). Przy gajtenogamicznym zapyłaniu przeprowadzanym sztucznie ilość nasion powstała na drodze samopylenia może jeszcze znacznie wzrosnąć.

Doświadczenia nad wpływem chowu wsobnego prowadzone są od 1958 r. na kilkudziesięciu liniach wsobnych, przy czym niektóre z nich znajdują się już w drugiej, inne w trzeciej generacji. Linie te z reguły już w pierwszym pokoleniu wykazują bardzo duże wyrównanie cech dotyczących pokroju i typu krzaka, wielkości i kształtu liści oraz tempa rozwoju. Być może, że niektóre z tych cech uwarunkowane są cyto-

plazmatycznie, skutkiem czego wszystkie rośliny potomne podobne są do osobników matecznych i nie wykazują oczekiwanych rozszczepień.

Oslabienie żywotności linii wsobnych przejawia się przede wszystkim w zwiększonej wrażliwości na choroby wirusowe, mniejszej zimotrwałości i w wyraźnie obniżonym plonie zielonki i nasion. Reakcja poszczególnych linii na chów wsobny jest przy tym bardzo różnorodna — istnieją linie o depresji dochodzącej do 40% (w stosunku do potomstwa powstałego z obcozapylecia) a równocześnie linie, które nie wykazują żadnej depresji, lub nawet w niektórych przypadkach mogą przekraczać plonem i żywotnością rośliny kontrolne. Ciekawe jest przy tym, że linie nie wykazujące depresji pochodzą zwykle od roślin o dużej skłonności do samozapylecia. Obliczenia współzależności między plonem zielonki linii wsobnych a stopniem samopłodności roślin macierzystych wykazały, że jest ona dość znaczna, gdyż współczynnik korelacji wynosi $r = +0,436$ i jest istotny. Oznacza to, że potomstwo powstałe z samozapylecia u roślin o dużym stopniu samopłodności jest na ogół bardziej żywotne i plenne niż potomstwo roślin o niskiej samopłodności.

W celu zbadania efektu heterozji wykonano szereg krzyżówek między poszczególnymi liniami jak i między liniami a odmianą Wielkolistną i różnymi poliploidalnymi ekotypami.

Mimo bogatego materiału doświadczalnego nie udało się stwierdzić jakiegokolwiek wpływu zjawiska heterozji na potomstwo uzyskane ze sztucznych krzyżówek. Otrzymane plony zielonki w g z rośliny kształtowały się następująco:

	Doświadczenie I	w %
linie wsobne S_3	263 g	100.0
potomstwo ze s w o b o d n e g o obcozapylecia	379 g	144.1
	Doświadczenie II	
linie wsobne S_3	338 g	100.0
s z t u c z n e „m i e s z a ń c e” międzyliniowe	317 g	93.7
potomstwo ze s w o b o d n e g o obcozapylecia	394 g	116.6
	Doświadczenie III	
linie wsobne S_3	265 g	100.0
s z t u c z n e „m i e s z a ń c e” linii z poliploidalnymi ekotypami	263 g	99.2
potomstwo ze s w o b o d n e g o obcozapylecia	394 g	148.7

Wyniki zarówno zacytowanych doświadczeń jak i w poprzednim roku prowadzonych obserwacji na potomstwie sztucznie wykonanego top-crossu wskazują jasno, że zjawisko heterozji u mieszańców sztucznych nie wystąpiło, natomiast zaznaczyło się wyraźnie w potomstwie powstałym ze swobodnego obcozapylecia. Zjawisko to wytłumaczyć można tylko w ten sposób, że przy sztucznym krzyżowaniu zachodzi w przeważa-

jącym stopniu zapylenie własnym, a nie obcym pyłkiem i skutkiem tego plony tzw. „mieszańców” nie odbiegają zasadniczo od plonów uzyskanych z linii wsobnych. Przy swobodnym obcozapyleniu wykonanym przez owady ma miejsce w większości wypadków proces ksenogami, dzięki czemu potomstwo wykazuje w tym wypadku wyraźny efekt heterozji dając istotne zwwyżki plonu.

Używana więc dotychczas metodyka krzyżowania sztucznego może znaleźć tylko odpowiednie zastosowanie do koniczyny diploidalnej, która jest bardziej samobezpłodna niż forma tetraploidalna. U tej ostatniej krzyżówki należy przeprowadzać przy pomocy owadów zapyłających, które zapewniają większy udział obcego pyłku przy zapyłaniu niż ma to miejsce przy sztucznym krzyżowaniu przy pomocy kartoników, czy też zapalek.

W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono w ostatnim sezonie szereg krzyżówek na główkach uprzednio wykastrowanych. Ponieważ usuwanie pręcików u koniczyny czerwonej jest bardzo pracochłonne i natrafia w związku z tym na duże przeszkody zastosowano kastrację chemiczną przez zamaczanie kwiatostanów w 60% roztworze alkoholu etylowego. Koncentracja ta nie była szkodliwa dla kwiatów, gdyż zachowywały one po zabiegu normalny wygląd. W trakcie zanurzania kwiatostan naciskano palcem, aby usunąć z kwiatów powietrze. Zanurzenie w alkoholu trwało 10 sekund, po czym główki przepłukiwano wodą. Jakkolwiek kwiaty i zalążki nie wykazywały widocznych zmian pod wpływem stosowanej koncentracji, to jednak liczba osadzonych następnie nasion była bardzo niska (średnio 1 nasiono na główkę), co wskazywałoby na niekorzystne działanie alkoholu na proces zapłodnienia i dalszy rozwój zarodka. Przy krzyżowaniu bez kastrowania liczba nasion na główkę była prawie dziesięciokrotnie wyższa, wynosząc średnio 11,25. Podobną wartość uzyskano przy sztucznym samozapyleniu. W stosunku do tego liczba nasion przy swobodnym obcozapyleniu była znacznie wyższa i wynosiła 19,4%.

Tak znaczne obniżenie osadzania nasion przy kastracji kwiatów za pomocą alkoholu dyskwalifikuje niestety tę metodę w zakrojonych na szeroką skalę pracach hodowlanych, gdzie chodzi zwykle o uzyskanie odpowiednio dużego materiału wyjściowego. Przy stosowaniu więc metod heterozyjnych należy u koniczyny tetraploidalnej oprzeć się głównie na zapyłaniu przez owady.

I w tym jednak wypadku nie można zupełnie uniknąć pewnej liczby gajtenogamicznego zapyłania, to znaczy samozapylenia w obrębie główki czy też rośliny, ponieważ owady zapyłające z reguły pobierają nektar czy też pyłek z kilku kolejnych kwiatów na tym samym kwiatostanie, względnie zapyłając między sobą główki należące do tej samej rośliny.

Samo stwierdzenie wysokiej samopłodności u koniczyny tetraploidalnej nie przesądza jednak sprawy, w jakim stopniu zachodzi auto- a w jakim ksenogamia w warunkach naturalnych, gdyż przy dużej ilości obcego pyłku, pyłek własny wykazuje na ogół słabszą zdolność konkurencyjną, a jego łagiewki rosną wolniej.

W 1964 r. rozpoczęto więc badania w celu stwierdzenia faktycznego stopnia samozapylenia w warunkach naturalnego kwitnienia. Do doświadczenia wybrano rośliny o liściach pozbawionych znamienia, która to cecha jest recesywna. Osobniki więc wykazujące ją są homozygotyczne pod względem tego genu. Rośliny te otoczone były osobnikami o wyraźnie zaznaczonym znamieniu, czyli posiadające allele o charakterze dominującym. Rośliny bez znamienia kwitły swobodnie, a jedynie kilka główek izolowano w celu oznaczenia stopnia samopłodności w warunkach sztucznych. Po zebraniu nasion i punktowym ich wysiewie w skrzynkach, liczono i usuwano wszystkie te rośliny, które posiadały znamię, a więc powstały na drodze obcozapylenia. Okazało się, że stopień obcopylności był bardzo różny u poszczególnych roślin macierzystych i wahał się od 40 do 99%, wynosząc średnio 73%. Wprawdzie badania te oparte były na podstawie obserwacji potomstwa tylko 10 roślin macierzystych i dlatego nie dają jeszcze dokładnego obrazu stopnia ksenogamii zachodzącej w całej populacji, pozwalają jednak wnioskować, że przeważająca część potomstwa, mimo dużej skłonności do samopłodności, jest produktem obcopylenia.

Zjawisko to jest korzystne z punktu widzenia hodowlanego, gdyż zabezpiecza w pewnym stopniu populację przed chowem wsobnym i pozwala na pełniejsze wykorzystanie zjawiska heterozji. Z drugiej strony wysoka samopłodność umożliwia wybór i ocenę linii wsobnych, które mają być komponentami przyszłej odmiany heterozyjnej. Wysoka samopłodność przy równoczesnej skłonności do obcopylności w warunkach swobodnego okwitania stwarza więc korzystne perspektywy dla przyszłej hodowli i umożliwia oparcie jej na osobnikach samopłodnych.

Ze względu na to, że rośliny samopłodne wykazują na ogół wysoki stopień obcopylności w warunkach swobodnego okwitania, a równocześnie depresja w plonie jest u nich znacznie niższa niż u roślin samobezpłodnych, są one niewątpliwie najcenniejszym materiałem wyjściowym.

Niestety przebadanie wszystkich roślin na ich stopień obcopylności w warunkach naturalnych jest niemożliwe, a to chociażby ze względu na to, że tylko nieliczne z osobników nadają się do tego rodzaju analizy i posiadają liście bez znamienia.

Wykorzystanie zjawiska heterozji u poliploidalnej koniczyny czerwonej ma nie tylko zasadnicze znaczenie przy podniesieniu produkcji zie-

lonki ale również, i to być może w jeszcze większym stopniu, w podniesieniu plonu nasion.

Poza wieloma czynnikami genetycznymi i cytologicznymi, o których już wielokrotnie wspomiano, takimi jak niekorzystna długość rurki kwiatowej, zbyt mała liczba główek, osłabiony rozwój generatywny oraz zaburzenia w podziałach redukcyjnych i przedwczesne zamieranie zarodków, niezmiernie ważnym czynnikiem obniżającym plon nasion jest depresja wywołana zbyt dużym zawężeniem populacji wyjściowej. Jak stwierdzono, wybór zbyt małej liczby nawet najplenniejszych roślin nie tylko że nie podnosi plonu nasion w hodowanym materiale, ale najczęściej znacznie go obniża. Fakt ten spowodowany jest poza niekorzystnym wpływem chowu wsobnego jeszcze zbyt dużym obniżeniem liczby alleli sterylności warunkujących samoniezgodność u koniczyny. Z prac Williamsa (4) wiadomo, że alleli tych jest u koniczyny czerwonej 36. Warunkują one zarówno samoniezgodność roślin, to znaczy uniemożliwiają kiełkowanie pyłku na własnym znamieniu posiadającym takie same allele, jak również powodować mogą niezgodność między poszczególnymi roślinami o podobnej budowie genetycznej alleli sterylności. Gdy alleli tych w populacji jest dużo, roślin wykazujących zjawisko niezgodności (czyli wzajemnie niepłodnych) jest niewiele, gdyż większość kombinacji krzyżówkowych jest płodna. Odwrotnie, gdy roślin wyjściowych jest kilka, powstaje szereg grup roślin intersterylnych, co wpływa obniżająco na osadzanie się nasion. Przy dwóch roślinach wyjściowych diploidalnych o różnej budowie genetycznej alleli sterylności, np. $S_1 S_2$ i $S_3 S_4$, w pierwszym pokoleniu powstaną 4 grupy roślin intrasterylnych o budowie $S_1 S_3$, $S_1 S_4$, $S_2 S_3$ i $S_2 S_4$ a w następnych pokoleniach 6 grup o następujących kombinacjach alleli: $S_1 S_2$, $S_1 S_3$, $S_1 S_4$, $S_2 S_3$, $S_2 S_4$, $S_3 S_4$. Jeżeli rośliny te będą występować w jednakowych liczbach, to co szósta krzyżówka będzie niepłodna. Poza tym, we wielu nawet płodnych kombinacjach położywa pyłku nie będzie kiełkować na znamieniu partnera, a to w tych przypadkach, gdy pyłek ten posiada ten sam allel sterylności, np. w kombinacji $S_1 S_2 \times S_1 S_3$ tylko gamety pyłku zawierające allel S_3 będą kiełkowały na znamieniu rośliny matecznej, natomiast pyłek niosący allel S_1 nie będzie funkcjonował.

Aby więc zapewnić normalne plonowanie, zróżnicowanie genów sterylności musi być bardzo duże i obejmować możliwie wszystkie istniejące w gatunku allele. W związku z tym nie można ograniczać się do wyboru kilkunastu najlepszych i najbardziej produkcyjnych pod względem plonu nasion roślin, bo prowadzić to będzie nie do podniesienia, lecz obniżenia zarówno produkcji nasiennej jak i plonu zielonki. Wprawdzie ostatnie prace Denwarda (2) wskazują na możliwość zachodzenia mutacji w obrębie genów sterylności, czyli ich zmiany i spontanicznego różnico-

wania się, ale niewątpliwie różnicowanie to nie jest dostateczne i lepiej jest zapewnić od razu przyszłej odmianie szeroką bazę genetyczną, wybierając możliwie dużą liczbę pojedynków i o różnym pochodzeniu.

Ważnym momentem w hodowli heterozyjnej jest możliwie pełne przykrzyżowanie poszczególnych komponentów odmiany. W tym celu stosuje się coraz szerzej u buraków cukrowych, kukurydzy, a nawet cebuli formy męsko-sterylne. Rośliny takie znaleziono również w koniczynie czerwonej i to zarówno w obrębie form di- jak i poliploidalnych. Posiadają one w różnym stopniu zdegenerowane pylniki, od zupełnie pustych i nierozwiniętych do takich, które wykazują pewną ilość słabo wykształconego, najczęściej zlepionego w grudki pyłku. Również stopień wykształcenia pyłku w obrębie poszczególnych roślin męsko-niepłodnych może być różnorodny, przy czym niektóre kwiatki mogą mieć dość dobrze wykształcone ziarna pyłku, inne zaś zupełnie zdegenerowane.

Rośliny męsko-sterylne po ich swobodnym obcozapyleeniu dają w potomstwie różnorodną liczbę roślin męsko-niepłodnych. Być może, że męska sterylność u badanych roślin koniczyny przekazywana jest przez cytoplazmę i współdziałające z nią geny, względnie uwarunkowana jest wyłącznie przy pomocy genów. Zagadnienie to będzie badane w roku przyszłym przez wykonywanie szeregu krzyżówek roślin męsko-sterylnych z roślinami normalnymi.

Niestety posiadane formy męsko-niepłodne są słabsze niż normalne, co wskazywałoby również na pewne obniżenie ogólnej żywotności u tych form. Dlatego wątpić należy czy będą one mogły być wykorzystane do przyszłej hodowli heterozyjnej.

Podsumowując dotychczasowe wyniki doświadczeń nad koniczyną poliploidalną, można by już nakreślić ogólny plan hodowli, którego celem byłoby nie tylko podniesienie żywotności i plonu zielonki, ale również utrzymanie stosunkowo wysokiej produktywności nasion.

Materiałem wyjściowym do hodowli poliploidalnej powinny być zarówno krajowe odmiany hodowlane, jak i ekotypy miejscowe o różnym pochodzeniu i genotypie. Po dokładnym zbadaniu ich wartości uprawowej, jak i przede wszystkim zimotrwałości oraz odporności na choroby i szkodniki, należałoby w kilku najlepszych i najplenniejszych pod względem plonu nasion populacjach zdwoić liczbę chromosomów. Liczba wyjściowych roślin poliploidalnych w każdej populacji powinna być dość duża i wynosić co najmniej kilkanaście lub kilkadziesiąt osobników C_0 . Potomstwo tych roślin po przebadaniu cytologicznym powinno być prowadzone oddzielnie i przebadane na trwałość, mrozoodporność i odporność na choroby i szkodniki na polach zakażonych rakiem koniczynowym i nematodami w siewach rzędowych.

Zbioru nasion należałoby dokonać w trzecim roku wegetacji i materiał ten wysadzić punktowo w szkółkach.

Na wybranych w drugim roku wegetacji pojedynkach powinno przeprowadzić się sztuczne izolacje (na kilku główkach) celem zbadania stopnia samopłodności i otrzymania nasion z samozapylenia. Wszystkie zdyskwalifikowane osobniki należy usunąć przed kwitnieniem (ok. 75% roślin) zostawiając tylko taką liczbę roślin, która zapewniłaby dobre wzajemne przepylenie w szkółce. Materiał pochodzący z obcozapylenia wybranych pojedynek służyłby w następnym roku do założenia małego doświadczenia porównawczego na plon zielonki i nasion.

Po uzyskaniu wyników z doświadczenia należałoby założyć polycross z najlepszych potomstw pojedynek przy użyciu nasion z samozapylenia. Zebrany z polycrossu materiał służyłby do stworzenia odmiany syntetycznej, przy czym liczba linii biorących w niej udział powinna być duża i wynosić nie mniej jak 10. Uzyskany efekt heterozyjny powinno się zbadać w równoległym doświadczeniu porównawczym.

Następny cykl hodowlany rozpoczynałby się od ulepszonej w ten sposób populacji heterozyjnej, która powinna być znów badana na polu zakażonym rakiem koniczynowym i nematodami.

Powyższa metoda zbliżona byłaby do metody selekcji powracającej opisaney dla nostrzyku przez Johnsona (3). Zarówno bardzo poważne zwyczajki plonu uzyskane tą drogą u nostrzyku jak i obserwacje własne nad koniczyną poliploidalną rokuja otrzymanie tą drogą dobrych rezultatów.

LITERATURA

1. Bingefors S. Ellerström S. Zeit. f. Pflanzenzücht. 51, 315—334, 1964.
2. Denward Th. I. Hereditas 49, 189—202, 1963. II. Hereditas 49, 203—235, 1963.
3. Johnson I. J., El Banna A. S. Agron. J. 49, 120—125, 1957.
4. Williams R. D., Williams W. II. J. Gen. 48, 51—68, 1947a. III. J. Gen. 48, 69—78, 1947a.