

## CYTOLOGICZNE PODSTAWY SELEKCJI ODMIAN POLIPLOIDALNYCH I JEJ METODYKA

A. FILUTOWICZ

Zakład Cytologii i Genetyki IHAR — Bydgoszcz

Selekcja odmian poliploidalnych we wszystkich etapach hodowli, począwszy od materiału wyjściowego aż do nasion oryginalnych, w dużej mierze opiera się na badaniach cytologicznych. Konieczność wykonania wielu tysięcy oznaczeń liczby chromosomów w materiale matecznym skłoniła hodowców do korzystania z bardzo szybkich metod badań cytologicznych, dających przy tym dostatecznie wyraźne i pewne wyniki. Metoda tych badań jest w zasadzie nieskomplikowana, wymaga jednak precyzji w wykonaniu i bezbłędności w obserwacji mikroskopowej. Z tego względu w hodowli roślin poliploidalnych korzysta się niekiedy z dodatkowych kryteriów poliploidalności, jak wielkość ziarn pyłku, długość szparek oddechowych lub grubość korzonków zarodkowych u żyta itp.

Te dodatkowe kryteria poliploidalności są tak długo pomocne, dopóki w badanym materiale mamy do odróżnienia formy diploidalne i tetraploidalne. Z chwilą jednak, gdy w materiale hodowlanym znajdujemy oprócz diploidów i tetraploidów egzemplarze triploidalne, a co gorsze aneuploidalne, jedynym i niezawodnym kryterium oceny stopnia poliploidalności jest dokładne policzenie liczby chromosomów w tkankach somatycznych i przebadanie prawidłowości przebiegu mejozy.

Pierwszą czynnością, od której zależy udanie się preparatu, jest prawidłowe pobranie materiału do badań cytologicznych. Rodzaj pobranego materiału zależeć będzie od badanej rośliny oraz celu badań cytologicznych. Chcąc oznaczyć liczbę somatyczną chromosomów pobieramy do badania wierzchołki wzrostu korzonków, pędów względnie bardzo młode listki. Dla zbadania przebiegu podziału redukcyjnego używamy młodych pylników, w których podział mejotyczny prześledzimy w komórkach macierzystych pyłku. Pobranie materiału do badań cytologicznych w celach hodowlanych jest nieco odmienne niż w pracowniach naukowych dla badań botanicznych.

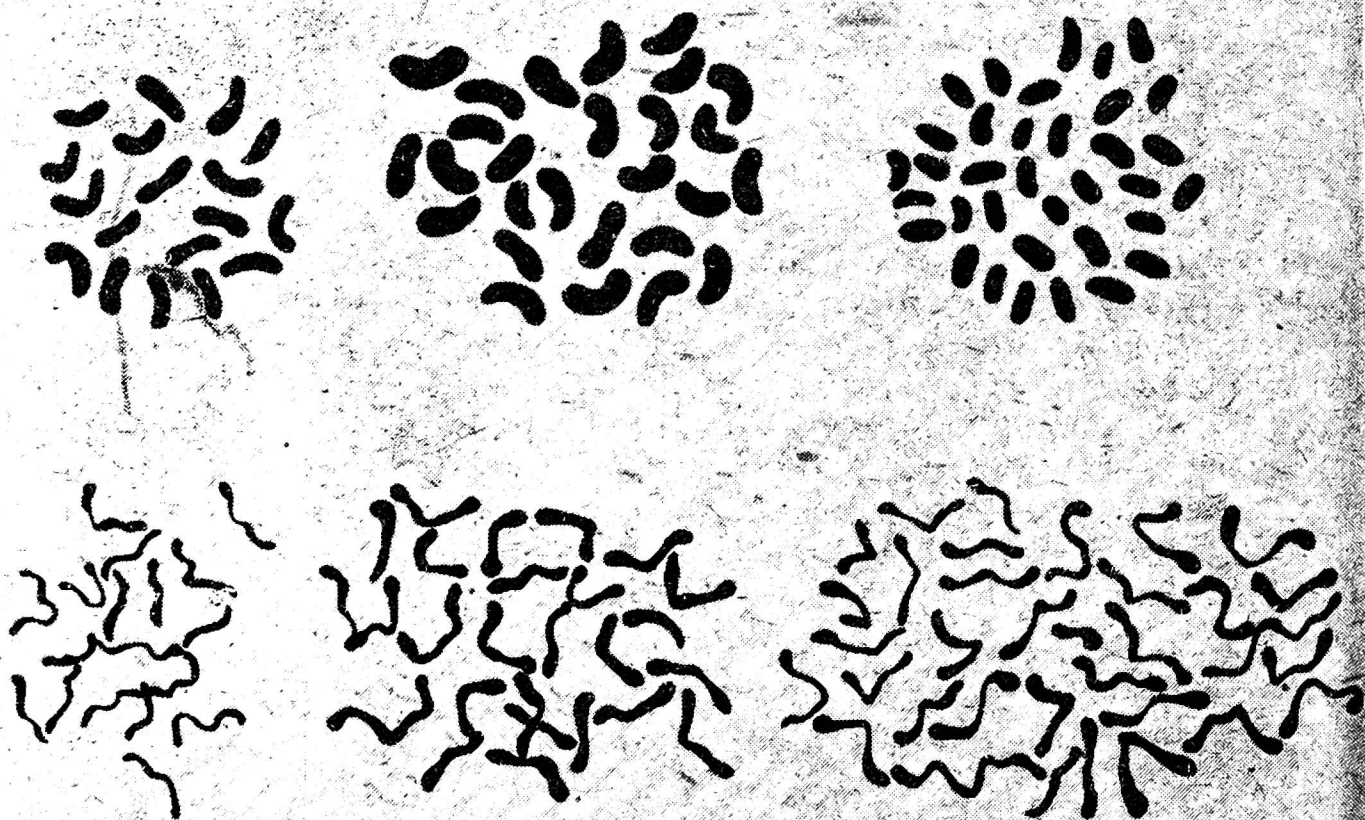
W hodowli zależy nam przede wszystkim, aby badany obiekt, z którego pobieramy próbe, pozostał przy życiu w stanie możliwie nieuszkodzonym. Rzadko więc pobieramy do badań nad chromosomami somatycznymi wierzchołki korzonków zarodkowych, używamy najczęściej wierzchołków wzrostu z korzonków bocznych. Pozwala to nam na zachowanie rośliny przy życiu. U szeregu roślin, np. u traw i koniczyn, można pobrać próbe do badań także z korzonków zarodkowych, ponieważ rośliny te bardzo łatwo regenerują korzenie. Pobranie próby bez zniszczenia rośliny

szczególnie jest ważne w stosunku do materiału wyjściowego ( $C_0$ ), który jest zazwyczaj liczebnie mały i bardzo cenny. Pobierając materiał do badań z wierzchołków pędu staramy się go w ten sposób pobrać, ażeby nie uszkodzić oczek uśpionych, z których roślina zregeneruje pęd. U buraków cukrowych bardzo dobre preparaty otrzymuje się z siewek dwutygodniowych, u których zaznaczają się dopiero liście środkowe; pobrane w tym stadium liście sercowe wykazują dużo podziałów komórkowych łatwych do policzenia. Osobnik, z którego pobieramy próbę, rośnie nadal i może być zachowany do dalszej hodowli.

Niezależnie od tego w jaki sposób pobieramy materiał do badań, rośliny powinny znajdować się w dobrych warunkach wzrostu, bo wtedy w merystemach znajdziemy dostateczną liczbę podziałów komórkowych, co pozwoli na wyszukanie odpowiednich do liczenia płytek metafazowych.

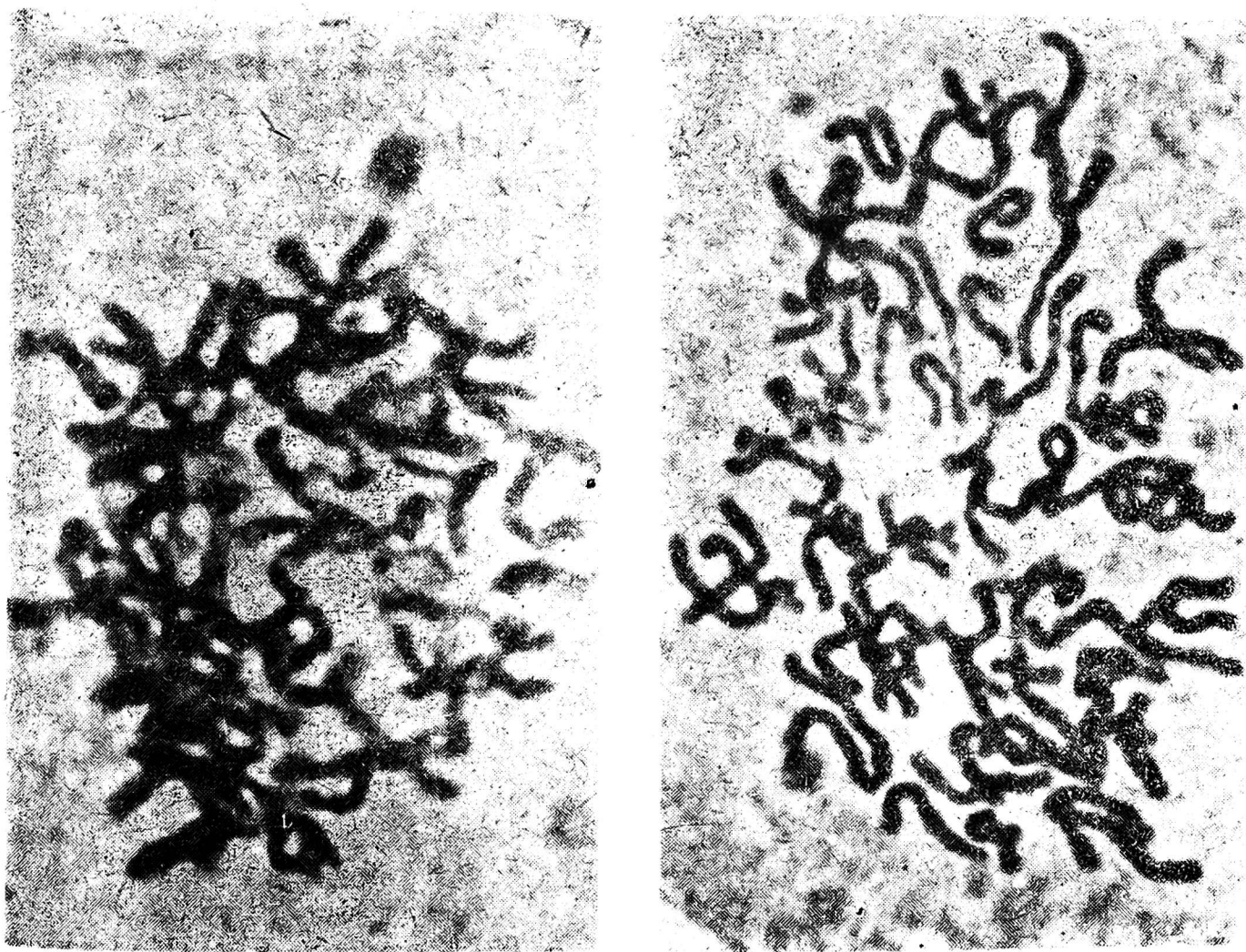
Na kilka godzin przed pobraniem próby rośliny powinny być zroszone i znajdować się w optymalnych warunkach wzrostu jeśli chodzi o temperaturę.

U niektórych roślin o bardzo długich chromosomach, np. u bulwy, u pszenicy, korzystne jest skrócenie chromosomów przez poddanie roślin na kilka godzin przed pobraniem materiału do analiz niskiej temperaturze. Po okresie optymalnego wzrostu rośliny stawiamy do chłodni o temp. około  $+4$  do  $6^\circ\text{C}$ . Skrócenie chromosomów u niektórych gatunków w stosunku do pierwotnej ich długości jest wielokrotne. U buraków cukrowych np. chromosomy dobrze ochłodzone podobne są do chromosomów w mejozie, a nawet nieco krótsze. Rysunki i fotografie tak traktowanych chromosomów podała M. Piotrowicz (rys 1). U niektórych gatunków chłodzenie nie powoduje tak wybitnego skrócenia (np. u pszenicy) jak na rys. 1.



Rys. 1. *Beta vulgaris* L. — górny rząd — chromosomy po schłodzeniu (diploid, triploid, tetraploid); dolny rząd — to samo bez chłodzenia (wg M. Piotrowicz)

Oznaczenia liczby chromosomów w hodowli roślin dokonujemy szybkimi metodami. Metody te poza swoją szybkością mają i tę zaletę, że możemy sztucznie rozsunać chromosomy przez naciskanie igłą miejsca, w którym znajduje się badana komórka. Liczenie np. chromosomów u tak trudnego obiektu, jakim jest bulwa (102 chromosomy), w preparatach przygotowanych metodą parafinową jest bardzo trudne, nie sprawia natomiast większego trudu policzenie chromosomów w preparacie rozmazowym z zastosowaniem rozplaszczania komórki przy pomocy igły (rys. 2). To rozplaszczanie komórki przy pomocy igły dokonujemy przy średnim powiększeniu mikroskopowym zachowując ostrożność, aby nie uszkodzić błon komórki przez zbyt silne ugniatanie szkiełka nakrywkowego. Z tego też względu liczymy chromosomy tylko w komórkach nieuszkodzonych, ponieważ przy uszkodzeniu część chromosomów może wypłynąć poza obręb komórki.



Rys. 2. *Helianthus tuberosus* L. — z lewej komórka normalna, z prawej komórka rozgnieciona

Z szybkich metod mikrotechnicznych posługujemy się metodami rozmazowymi, barwiąc preparaty karminem, orceiną lub nigrozyną. Z tych trzech metod dwie pierwsze nie sprawiają nawet początkującym technikom specjalnych trudności, w metodzie nigrozynowej bardzo zaś często występują straty barwnika, co przeszkadza obserwacji. Na ogół technicy używają zbyt dużo tego barwnika, co przeszkadza przy rozgniataniu preparatu. Opanowawszy jednak technikę otrzymuje się bardzo dobre preparaty, których chromosomy wybarwione są na czarno, a plazma lekko sza-

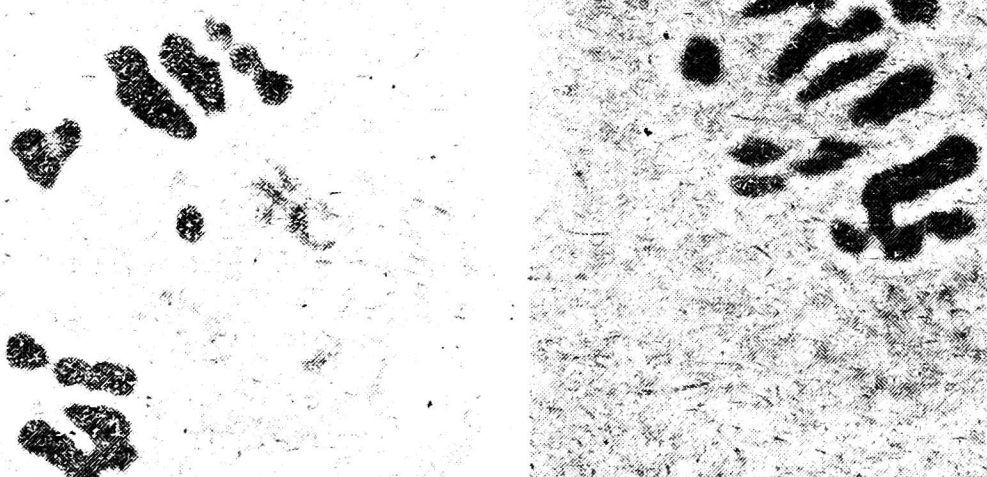
ra. W naszej pracowni metoda nigrozynowa jest najczęściej używana do wszystkich typów preparatów cytologicznych.

Z bardzo szybkich metod należy także wymienić liczenie chromosomów w preparatach rozmazowych, lecz bez barwienia preparatu, przy pomocy mikroskopu kontrastowo-fazowego. Materiał do badań po utrwaleniu i rozluźnieniu tkanek rozgniatany jest na szkiełku przedmiotowym.

Liczbę chromosomów oznaczamy w komórkach tkanek merystematycznych. W preparacie rozmazowym tkanki te można bardzo łatwo rozróżnić pod małym powiększeniem, ze względu na silniejsze wybarwienie się plazmy w porównaniu z komórkami innych tkanek. Liczba chromosomów w tkankach zróżnicowanych może znacznie odbiegać od liczby chromosomów charakterystycznej dla danego gatunku. Określenie liczby chromosomów powinno odbywać się na podstawie policzenia liczby chromosomów kilku dobrze wykształconych płytek metafazowych.

Najczęstszym błędem popełnianym przy wyszukiwaniu podziałów jest posługiwanie się zbyt dużym powiększeniem mikroskopu. Pierwszą czynnością powinno być wyszukiwanie w preparacie najlepszej partii, w której widzimy dużo podziałów komórkowych. Dopiero wtedy zwiększamy powiększenie mikroskopu do określonej wielkości.

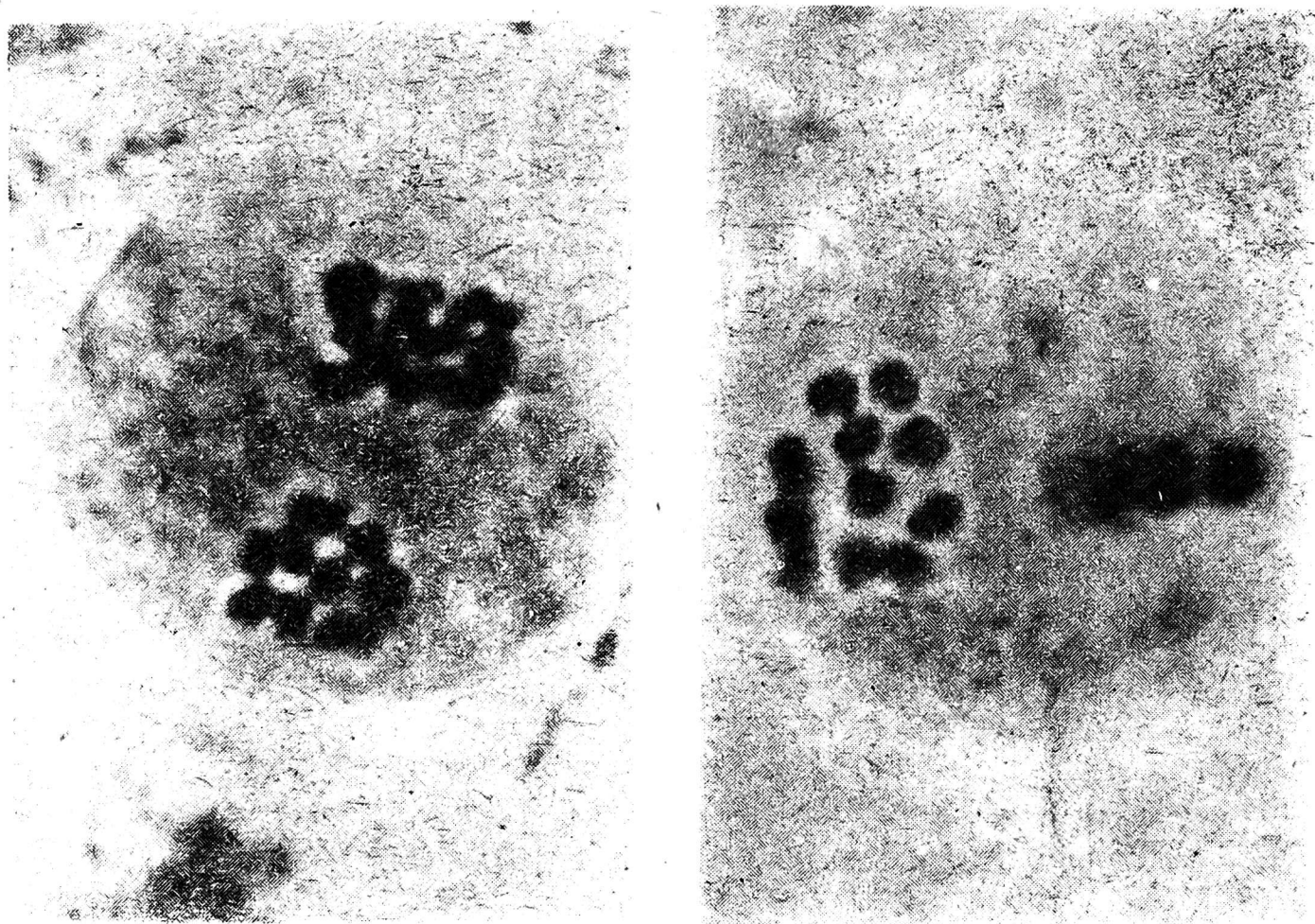
Ostateczne określenie liczby chromosomów u osobników, co do których mamy wątpliwości, czy są aneuploidami czy też formami euploidalnymi, powinno odbywać się w okresie mejozy. Przebadaanie komórek macierzystych pyłku pozwala nam na bezsporne określenie stopnia poliiploidalności. Określenia liczby chromosomów dokonujemy na komórkach w stadium anafazy I lub metafazy II. Policzenie chromosomów w metafazie I i autopoliiploidów jest bardzo trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe ze względu na tworzenie poliwalentów (rys. 3).



Rys. 3 *Beta vulgaris* L. K. m. p. — poliwalenty triploidu ( $2n = 27$ )

Policzenie w anafazie I liczby chromosomów na obu biegunach komórki da nam liczbę somatyczną chromosomów dla danego osobnika. Stwierdzenie nierównego rozdziału chromosomów na bieguny będzie świadczyć, że badany egzemplarz jest aneuploidem, triploidem, względnie osobnikiem euploidalnym wykazującym zaburzenia w podziale redukcyjnym.

W mejozie łatwiej dokonać obliczeń liczby chromosomów, bo w jednym rozmazie mamy często setki komórek macierzystych pyłku w tym samym stadium podziału. Policzenie liczby chromosomów w obu płytkach metafazy II możliwe jest tylko wtedy, gdy wrzeciona ułożone są równolegle (rys. 4). Przy ułożeniu wrzeciona prostopadłym (rys. 4) jedna płytka będzie w rzucie bocznym, druga będzie widziana z góry.



Rys. 4. *Beta vulgaris* L. K. m. p. Metafaza II. a — ułożenie wrzecion równoległe; b — ułożenie wrzecion prostopadłe

Wybarwienie chromosomów w okresie mejozy jest na ogół łatwiejsze. Wypreparowany pylnik rozgniatamy w kropli barwnika, który zawiera w sobie kwas octowy. Używamy najczęściej karminu, orceiny lub nigrozyny. U roślin o bardzo dużych pylnikach korzystne jest uprzednie utrwalenie w mieszance Carnoy'a. Nigrozyna jako barwnik do wybarwiania chromosomów w mejozie jest przez wielu badaczy niedoceniana. Umiejętnie zastosowany ten barwnik jest jednym z najlepiej wybarwiających barwników. Roztwór standardowy używany do badań nad mitozą należy rozcieńczyć 4- do 8-krotnie 50% kwasem octowym. To rozcieńczenie należy wypróbować w zależności od badanego obiektu. Barwiąc nigrozyną można prześledzić najwcześniejsze stadia podziału komórki, które zazwyczaj przy barwieniu orceiną, a zwłaszcza karminem, źle się wybarwiają.

Poza badaniami cytologicznymi, mającymi na celu określenie liczby chromosomów u badanego obiektu, w hodowli prowadzi się selekcję cytologiczną na określony sposób koniugacji chromosomów w mejozie. Autopoliploidy bowiem wykazują zjawisko samorzutnej regulacji liczby chromosomów do liczby wyjściowej znane pod nazwą „Breakdown“ lub „Herabregulierung“ oraz zjawisko słabej płodności u tetraploidów.

Fakt samoregulacji liczby chromosomów u niektórych sztucznie uzyskanych poliploidów zmusza do stałej kontroli cytologicznej materiałów poliploidalnych, nawet przy najściślejszej izolacji mającej na celu zabezpieczenie przed skrzyżowaniem z materiałem diploidalnym.

Literatura tego przedmiotu jest bardzo obszerna i nie ma potrzeby szczegółowo jej omawiać. Ogólnie należy stwierdzić, że w wielu wypadkach stwierdzono zależność między płodnością a prawidłowością podziału mejotycznego. Jeśli przebieg podziału mejotycznego jest prawidłowy we wszystkich fazach, należy spodziewać się wysokiej płodności. Jeśli natomiast obserwuje się zaburzenia w pewnych fazach podziału mejotycznego, należy spodziewać się słabej płodności. Reguła ta w obu wypadkach ma jednak sporo wyjątków. I tak: niekiedy przy nieprawidłowym podziale redukcyjnym obserwuje się doskonałą płodność, a w drugim wypadku przy prawidłowym podziale redukcyjnym obserwuje się słabą płodność.

Stwierdzenie multiwalentów w metafazie I jest najczęstszą przyczyną obniżenia płodności i skłonności do samoregulacji chromosomów. W takim wypadku bardzo często powstaje wrzeciono wielobiegunowe z wszystkimi konsekwencjami cytologicznymi tego zjawiska.

Z drugiej strony stwierdzono u niektórych gatunków poliploidalnych wysoką płodność mimo stałego tworzenia multiwalentów. *Hordeum bulbosum*, *Dactylis glomerata* czy *Phleum pratense* są dowodem, że tworzenie poliwalentów w metafazie I nie wpływa na prawidłowość dalszych stadiów podziału mejotycznego. Pomimo dużego procentu multiwalentów u *Dactylis* i *Phleum*, są one bardzo płodne. Wyciąga się z tego wniosek, że u tych gatunków płodność jest związana z czynnikami genetycznymi regulującymi prawidłowość dalszych podziałów mejotycznych.

Należy jednak zwrócić uwagę na niezgodność wyników podawanych przez różnych autorów, co należy przypisać różnicom genetycznym materiału wyjściowego i skomplikowaniu tego zagadnienia. Klasycznym przykładem pod tym względem jest rodzaj *Lycopersicum*, w obrębie którego jedne gatunki z reguły wykazują jako tetraploidy obniżoną płodność (np. *L. esculentum*) inne natomiast jako tetraploidy wykazują doskonałą płodność (np. *L. pimpinellifolium*). I tak u naszych tetraploidalnych odmian (*Lycopersicum esculentum*) otrzymanych w Bydgoszczy występuje wybitne obniżenie płodności, a u odmiany tetraploidalnej *L. pimpinellifolium* występuje nawet zwiększenie płodności przy gigantyczności wszystkich cech. Śledząc dokładnie mejozę u tych gatunków stwierdziliśmy, że u tetraploidalnych odmian *L. esculentum* przeważa typ koniugacji chromosomów w postaci multiwalentów i nieprawidłowości rozdziału chromosomów w anafazie I, a u tetraploidalnej odmiany *L. pimpinellifolium* stwierdzono przeważający typ koniugacji w postaci biwalentów i równy rozdział w anafazie I. Nasuwa się więc wniosek, że w obrębie tego rodzaju sposób koniugacji chromosomów decydującą wpływa na płodność i prawidłowość rozdziału chromosomów.

Potwierdzeniem tej tezy jest otrzymany przez nas tetraploidalny rajgras *Lolium perenne*, który jest bardzo płodny i w mejozie wykazuje bardzo wysoki odsetek koniugacji chromosomów w postaci biwalentów. Już z tego krótkiego przeglądu widać, że u niektórych gatunków prawidłowość przebiegu podziału redukcyjnego i związana z tym płodność spowodowana jest koniugacją chromosomów w biwalenty.

U innych gatunków tetraploidalnych o płodności decydują czynniki genetyczne, które mimo nieprawidłowości podziału redukcyjnego w pierwszych jego fazach gwarantują prawidłowość przebiegu dalszych faz. Występowanie multiwalentów nie zawsze jest więc wskaźnikiem bezpłodności.

Ponieważ zagadnienie to nie zostało jeszcze definitywnie w literaturze rozwiązane, w Zakładzie Cytologii i Genetyki prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie, czy w drodze selekcji można otrzymać buraki tetraploidalne dające w metafazie I wyłącznie biwalenty. Sądzymy, że z chwilą otrzymania takich rodów nie powinno się obserwować zjawiska samoregulacji oraz obniżenia płodności. Zachętą do tych doświadczeń były otrzymane wyniki u *L. perenne* i u tetraploidalnego żyta, u których obserwuje się tylko biwalenty. Obserwacje nad tworzeniem biwalentów u buraków cukrowych przeprowadzono na następujących generacjach: C<sub>0</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> śledząc sposób tworzenia biwalentów i dodatkowo prawidłowość tworzenia tetrad, oraz płodność pyłku.

Wyniki tych doświadczeń zestawiono w załączonej tabeli.

Z tabeli widzimy, że następne generacje w porównaniu z generacją C<sub>0</sub> wykazują znacznie prawidłowszy przebieg podziału redukcyjnego i zmniejszenie odsetka anormalnych tetrad. Wydaje się jednak, że będzie bardzo trudne uzyskanie egzemplarzy dających wyłącznie biwalenty, gdyż jeszcze w 6 generacji widzimy stosunkowo duży % multiwalentów.

Z przedstawionych tutaj prac i wyników doświadczeń wynika, że w hodowli poliploidalnych odmian należy prowadzić selekcję cytologiczną w określonym kierunku. W tym celu wybierając pojedynki należy w szkółkach umieścić znacznie większą liczbę roślin, aby móc na podstawie wyników badań cytologicznych eliminować typy o anormalnym przebiegu podziału redukcyjnego. Należy eliminować przede wszystkim osobniki o dużym odsetku anormalnych tetrad oraz osobniki tworzące nieparzyste koniugacje chromosomów (uni-triwalenty). W potomstwie takich egzemplarzy zawsze znajdziemy osobniki o zmniejszonej liczbie chromosomów, które wykazują ze zrozumiętego względu obniżoną płodność.

Generacja	C <sub>0</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>
% biwalentów	11,5	15,7	30,8	49,6
% anormalnych tetrad	37,1	26,4	21,5	3,1
% płodnego pyłku	73,4	79,5	81,2	90,8

#### LITERATURA

1. Berg K. H.: Autotetraploidie bei *Hordeum bulbosum* L. Züchter 8, 1936, s. 151—158.
2. Bleier H.: Neuere cytologisch-genetische Arbeiten in der Gattung *Triticum*. Fortschritte in der Landwirtschaft 1, 1926, s. 280—285.

3. Bleier H.: Bastardkaryologie. *Bibliographia Genetica* 11, s. 393 — 489.
4. Filutowicz A.: Rola kolchicyny w otrzymaniu roślin poliploidalnych. *Postępy Wiedzy Rolniczej* 1—2, 1950, s. 69—90.
5. Filutowicz A., Kuźdowicz A.: *Mikrotechnika roślinna*, PWRiL, 1951.
6. Greis H.: Vergleichende physiologische Untersuchungen an diploiden und tetraploiden Gersten, *Züchter* 12, 1'40, s. 62—73.
7. Hertzsch W.: Beobachtungen an polyploider *Vicia villosa*. *Z. f. Pflanzenzüchtung* 30, 1951, s. 210—217.
8. Kihara H.: Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mem. of the Coll. of Science, Kyoto Imper. Univers. Series B, nr 1, Art. 1: 1-200*, 1924.
9. Müntzing A.: Experiences from Work with Induced Polyploidy in Cereals, In *Svalöf 1886 — 1946*, s. 324—337, Lund 1948 (dort weitere Literaturangaben).
10. Rosen G.: 1946 a) A rapid method for sorting poliploid material. *Hereditas XXXII*: s. 129—130.
11. Rosen G.: 1946 b) Chromosomes determination in root-tips and leaves by the rapid orcein method. *Hereditas XXXII*: s. 551—554.
12. Rosen G.: 1947. The rapid nigrosine-method for chromosomecounts, applicable to all the growing tissues of the plant. *Hereditas XXXIII*: s. 567—570.
13. Schwanzitz F.: Über die Pollenkeimung einiger diploider Pflanzen und ihrer Autotetraploiden in Künstlichen Medien. *Züchter* 14, 1942, s. 273—282.
14. Schwanzitz F.: Einige kritische Bemerkungen zur Methode der Bestimmung der Polyploidie durch Messung der Pollen und Spaltöffnungsgröße. *Der Züchter* 22, 1952, s. 273—275.
15. Schlösser L. A.: Zur Frage der Genomstabilisierung bei Heteroploiden. *Biol. Zentralblatt* 54, 1934, s. 436—445.
16. Stebbins jr. G. L.: Types of Polyploids: Their Classification and Significance. *Advances in Genetics* 1, 1947, s. 403—429.
17. Tjmo J. H.: and Levan A.: The use of oxyquinoline in chromosome analysis. With appendix by Stafelt, M. G., The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity. *Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei* 2, 1950, s. 21—54.
18. Wettstein F.: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage I. *Z. ind. Abstammungs- und Vererbungslehre* 33, 1924, s. 1 — 236.
19. Wettstein F.: Experimentelle Untersuchungen zum Artbildungsproblem. I. Zellgrößenregulation und Fertilität einer polyploiden Bryum-Sippe. *Z. f. ind. Abstammungs- und Vererbungslehre* 74, 1937, s. 34—53.
20. Wettstein F.: und Straub J.: Experimentelle Untersuchungen zum Artbildungsproblem. III. Weitere Beobachtungen an polyploiden Bryum-Sippen. *Z. f. ind. Abstammungs- und Vererbungslehre* 80, 1942, s. 271—280.