

EFEKTYWNOŚĆ GYNOGENEZY U CEBULI W FIRMIE „SPÓJNIA” W NOCHOWIE

*Violetta Szulc-Sroga, Marian Pędziński, Wojciech Matuszak,
Małgorzata Majchrzak, Ewa Rubik*

„SPÓJNIA”, Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze, Sp. z o.o. w Nochowie

Wstęp

Cebula należy w naszym kraju do sześciu gatunków warzyw o największym znaczeniu gospodarczym. Jest ceniona nie tylko w przemyśle spożywczym, np. jako przyprawa kuchenna, ale coraz szersze zastosowanie znajduje w przemyśle farmaceutycznym.

Cebula w naszych warunkach klimatycznych jest gatunkiem dwuletnim. Wyhodowanie nowej odmiany trwa minimum 16 lat. Homozygotyczne linie podwojonych haploidów stanowią interesującą alternatywę dla hodowli konwencjonalnej i heterozyjnej ze względu na możliwość znacznego skrócenia poszczególnych etapów hodowli.

Drogą indukcji gynogenezy w kulturach pąków kwiatowych cebuli można uzyskać rośliny haploidalne, które po podwojeniu liczby chromosomów stanowią mogą źródło linii homozygotycznych

Materiał i metody

Do badań nad indukcją gynogenezy rozpoczętych w „SPÓJNIA” w Nochowie w 2001 roku użyto 16 linii hodowlanych. Rośliny donorowe prowadzone były zarówno w warunkach polowych, jak i szklarniowych. W pierwszej dekadzie kwietnia wysadzono w polu 8 genotypów roślin donorowych, gdzie rosły do 6 lipca, natomiast na początku marca wysadzono 8 zupełnie innych genotypów w warunkach szklarniowych.

Dwa tygodnie przed pękaniem osłonek kwiatostanowych, rośliny ze szklarni przenoszono do komory chłodniczej, zapewniając szesnastogodzinny fotoperiod i temp. 14°C. Natomiast z roślin rosnących w polu pąki pobierano bezpośrednio z tych warunków uprawy. Do badań pobierano pąki wielkości ok. 3,5–4,5 mm na jeden lub na dwa dni przed otwarciem kwiatów. Pąki pobierano w 18 terminach: od 22 maja do 9 lipca 2001 roku.

Zebrane pąki kwiatowe wysterylizowano poprzez potraktowanie ich 70% etanolem przez 30 sekund, następnie 5% chloraminą T przez 20 min i po trzykrotnym wypłukaniu w sterylnej wodzie umieszczano je na pożywcę indukcyjnej

A_1 [MUREN 1989] w płytkach Petriego o śr. 10 cm. Na jednej płytce umieszczano 20 pąków kwiatowych. Płytki zaklejano parafilmem i umieszczano w fitotronie w warunkach fotoperiodu: 16 godz. światła i 8 godz. ciemność, przy natężeniu światła 4000–6000 lux i temp. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Po ok. 30 dniach pąki przenoszono na pożywkę regeneracyjną R [BOHANEĆ i in. 1995]. Kolejnych pasaży na świeżą pożywkę regeneracyjną R dokonywano systematycznie co 30 dni.

Pierwsze zarodki pojawiły się 19 lipca, czyli po upływie ok. 60 dni od momentu rozpoczęcia hodowli w warunkach kontrolowanych.

Wydajność gynogenezy wyrażano poprzez liczbę rozwijających się niezapłodnionych zalążków w stosunku do stu pąków wyłożonych na pożywkę.

Gynogeniczne zarodki natychmiast przenoszono na pożywkę namnażającą MC 2 [NOWAK 2001] do probówek lub kolb i utrzymywano w tych samych warunkach świetlnych i temperaturowych jak w przypadku pąków kwiatowych.

W przypadku słabej regeneracji systemu korzeniowego rośliny będące podwojonymi haploidami pasażowano na pożywkę ukorzeniającą – U [NOWAK 2001] lub na pożywkę elongacyjną – L [NOWAK 2001] dla regeneracji liści. Na każdej z tych pożywek kultury cebul prowadzono nie dłużej niż 30 dni. Po wytworzeniu liści i systemu korzeniowego rośliny przenoszono do doniczek z odpowiednio przygotowanym substratem (wysterylizowany substrat torfowy zmieszany z piaskiem lub perlitem, w stosunku 2 : 1) i poddawano aklimatyzacji.

Ploidalność zregenerowanych roślin oceniano za pomocą cytometru przepływowego (FCM).

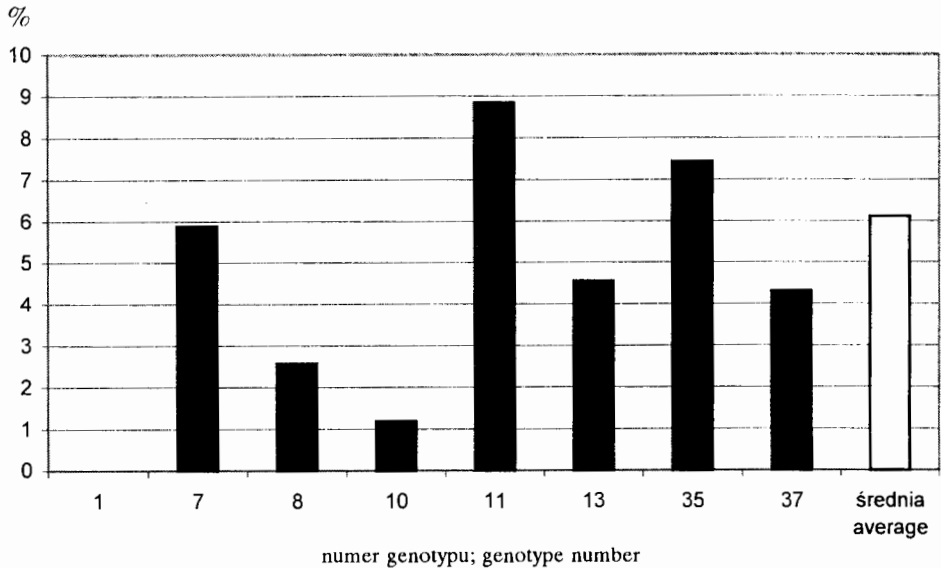
Rośliny haploidalne, u których genomy nie uległy spontanicznemu podwojeniu, poddawano procesowi kolchicynowania *in vitro*. W tym celu przygotowywano pożywkę MC 2 z dodatkiem kolchicyny ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Usuwno liście i system korzeniowy. Pozostałe zgrubienie cebuli dzielono wzdłuż na dwie części, a otrzymane połówki wykładano na pożywkę z kolchicyną i pozostawiano w ciemności przez 72 godz. w temp. 23°C – 25°C . Następnie dokładnie płukano trzy razy w destylowanej, sterylnej wodzie, osuszano na sterylnej bibule filtracyjnej i wykładano na pożywkę MC 2 bez kolchicyny dla regeneracji. Następnie, w celu lepszego rozwoju systemu korzeniowego lub liści, stosowano odpowiednio pożywkę U lub L.

Po ponownym badaniu cytologicznym diploidalne rośliny poddawano aklimatyzacji, natomiast rośliny haploidalne przygotowywano do diploidyzacji *in vivo*. Prace są kontynuowane.

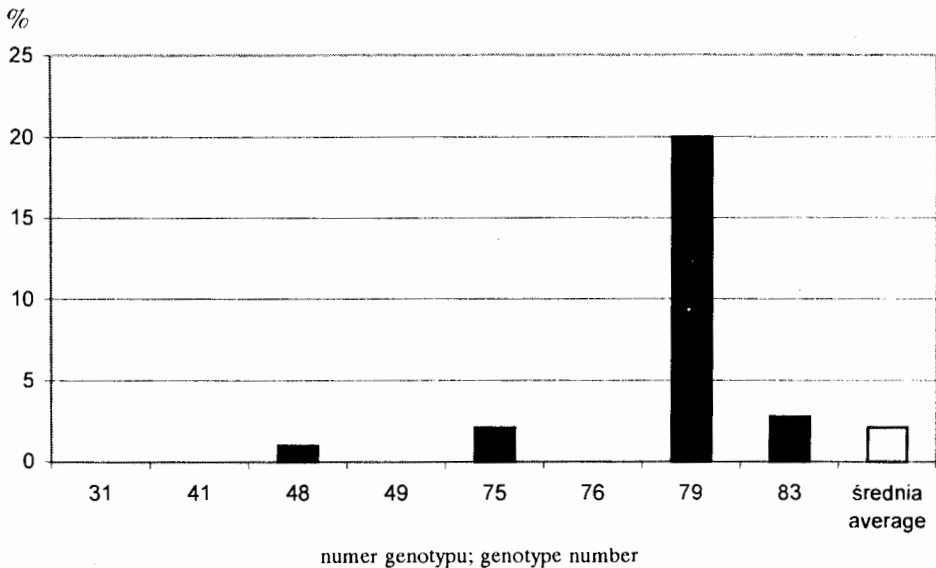
Wyniki i dyskusja

Ogółem na pożywkę indukcyjną A_1 wyłożono 12385 pąków kwiatowych, z tego 10953 pąki pochodziły od genotypów utrzymywanych w warunkach szklarniowych, natomiast 1432 pąki pochodziły od roślin prowadzonych w warunkach polowych. W wyniku tworzenia się kalusa i licznych zakażeń na pożywkę regeneracyjną pasażowano 10222 pąki, z tego 9561 pochodziło z materiału szklarniowego, natomiast 661 z materiału uprawianego w polu. W wyniku infekcji, głównie grzybowych i endogennych bakteryjnych, utracono na tym etapie aż 46,2% materiału pochodzącego z warunków polowych. Z 16 badanych genotypów, gynogenezę udało się zaindukować u 11 z nich, w tym u 7 genotypów pochodzących ze szklarni i tylko u 4 pochodzących z pola.

Wydajność gynogenezy dla poszczególnych genotypów prowadzonych w warunkach szklarniowych wahała się od 1 do 8 zarodków na 100 wyłożonych pąków, średnio wynosiła 6,11% (rys. 1). Natomiast pąki kwiatowe pochodzące z warunków polowych wykazywały średnią efektywność gynogenezy 2,12% (rys. 2). Na uwagę zasługuje fakt, że u genotypu nr 79 otrzymano aż 20 gynogenicznych zarodków na 100 pąków (rys. 1, 2).



Rys. 1. Efektywność gynogenezy w % (materiał pobrany ze szklarni)
 Fig. 1. Efficiency of gynogenesis (plants grown under greenhouse conditions)



Rys. 2. Efektywność gynogenezy w % (materiał pobrany z pola)
 Fig. 2. Efficiency of gynogenesis in percentage (plants grown under field conditions)

Zaobserwowano, iż efektywność gynogenezy jest uzależniona m.in. od genotypu rośliny donorowej [JAKSE i in. 1996]. Zależność efektywności gynogenezy od genotypu roślin donorowych obserwowana była również w innych laboratoriach [NOWAK 1999a]. W 1996–1998 roku w Katedrze Genetyki, Hodowli i Nasienictwa AR w Krakowie badaniami objęto 10 polskich odmian cebuli oraz materiały hodowlane z dwóch spółek – 15 linii ze „SPÓJNI” w Nochowie i 4 z „POLANU” w Krakowie. Na 19 obiektów u pięciu nie udało się zaindukować rozwoju zarodków, u kolejnych 8 rozwijało się poniżej jednego zarodka ze 100 pąków znajdujących się w kulturze, natomiast powyżej 4% rozwoju obserwowano u linii 511 ze „SPÓJNI” w Nochowie i u dwóch linii A i B z „POLANU” w Krakowie [ADAMUS i in. 1999].

Ogółem otrzymano 598 zarodków gynogenicznych, z czego 54% uległo konwersji dając 672 rośliny, co oznacza, że przeciętnie z każdego zarodka otrzymano 2 osobniki. W tym, z materiału pobranego z pola, zareagowało tylko 14 zarodków.

Ze zregenerowanych roślin 543 poddano analizie ploidalności za pomocą cytometru przepływowego (tab. 1). Na podstawie otrzymanych wyników wnioskować można, że 109 roślin (tj. 20%) to podwojone haploidy. Pozostałe osobniki należały do innych grup ploidalności, spośród których 430 roślin (tj. 79%) było haploidami. Dzięki podejmowanym próbom podwajania liczby chromosomów przez kolchicynowanie *in vitro*, którym poddano wszystkie haploidy (tj. 430 roślin), otrzymano dodatkowo 46 podwojonych haploidów. Wysokim udziałem form diploidalnych zarówno po gynogenezie, jak i po kolchicynowaniu charakteryzowały się szczególnie dwa genotypy: nr 11 i 35.

Tabela 1; Table 1

Ploidalność roślin uzyskanych drogą gynogenezy i kolchicynowania
Ploidy level of plants derived from gynogenesis and colchicine treatment

Miejsce pobrania materiału Plant growth conditions	Nr genotypu Genotype number	Ploidalność roślin po gynogenezie; Ploidy level of plants obtained by gynogenesis				Ploidalność po kolchicynowaniu Ploidy level of plants after colchicine treatment			
		1x	2x	4x	3x	1x	2x	4x	6x
Szklarnia Greenhouse	7	20	3	–	–	7	–	–	–
	8	10	10	2	–	7	1	–	–
	10	7	1	–	–	1	1	–	–
	11	222	54	–	–	42	20	7	–
	13	13	4	–	–	7	1	1	–
	35	126	35	1	1	46	21	6	1
	37	23	2	–	–	5	1	2	–
	razem; total	421	109	3	1	115	45	16	1
Pole Field	75	4	–	–	–	–	–	–	–
	79	1	–	–	–	–	–	–	–
	83	4	–	–	–	1	1	–	–
	razem; total	9	–	–	–	1	1	–	–

Inni autorzy obserwowali także zależność stopnia ploidalności gynogenicznych roślin od genotypu materiałów wyjściowych. Wysokim udziałem form diploidalnych (50–79%) charakteryzowały się badane cztery odmiany: ‘Wolska’, ‘Czeraniakowska’, ‘Sochaczewska’ i ‘Kutnowska’ [NOWAK 1999b].

Rośliny donorowe nie były sprawdzane testem izoenzymatycznym PGI, dlatego trudno stwierdzić, czy wszystkie pąki były pobierane z form heterozygotycznych i czy podwojone diploidy zostały otrzymane w wyniku rozwoju tkanki generatywnej.

Prace nad gynogenezą zaindukowaną w 2001 roku są kontynuowane. Rośliny haploidalne są przygotowywane do diploidyzacji w warunkach *in vivo*, a całość materiału do identyfikacji markerami izoenzymatycznymi PGI w celu sprawdzenia ich homozygotyczności.

Należy podkreślić, że przedstawione wyniki dotyczą tylko jednego cyklu, wymagają zatem sprawdzenia na większej liczbie doświadczeń.

Wnioski

1. Wytwarzanie gynogenicznych zarodków jest prawdopodobnie silnie uzależnione od genotypu. Indukcja gynogenezy nie powiodła się u 5 z 16 badanych obiektów.
2. Efektywność gynogenezy wzrastała, gdy pąki kwiatowe pobierane były z roślin umieszczanych w kontrolowanych warunkach – temp. 14°C.
3. Pozyskiwanie pąków kwiatowych z roślin rosnących w komorze klimatycznej i szklarni pozwala uniknąć endogennych infekcji bakteryjnych i grzybowych, występujących w warunkach polowych.
4. Większość gynogenicznych populacji (ok. 80%) stanowią haploidy, dlatego należy przeprowadzać zabiegi diploidyzacji.
5. Wysoka tendencja do produkcji roślin diploidalnych była obserwowana szczególnie u dwóch genotypów.

Literatura

- ADAMUS A., MICHALIK B., NOWAK E. 1999. *Wpływ genotypu na rozwój zarodków w kulturze in vitro pąków kwiatowych cebuli*. Materiały VIII Ogólnopolskiego Zjazdu Naukowego „Hodowla roślin ogrodniczych u progu XXI wieku”. Akademia Rolnicza, Lublin, 4-5 II 1999: 201–203.
- BOHANEK B., JAKSE M., IHAN A., JAVORNIK B. 1995. *Studies of gynogenesis in onion (Allium cepa L.) induction procedures and benetic analisis of regenerants*. Plant Science 104: 215–224.
- JAKSE M., BOHANEK B., IHAN A. 1966. *Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (Allium cepa L.) cultivars and analisis of regenerants*. Plant Cell Raports 15: 934–938.
- MUREN R. 1989. *Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion*. HortScience 24: 833–834.

NOWAK E. 1999a. *From embryos to gynogenic onion plants. Gametic embryogenesis in monocots*. Warsztaty ogrodnicze, Kraków, 10–13 VI 1999: 39–40.

NOWAK E. 1999b. *Wykorzystanie gynogenicznych roślin w hodowli cebuli*. Materiały z konferencji „Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin”. Instytut Warzywnictwa, Skierniewice, 30 XI 1999: 12.

NOWAK E. 2001. *Charakterystyka gynogenicznej populacji oraz metody podwajania genomu haploidalnych roślin cebuli (Allium cepa L.)* – praca doktorska. Akademia Rolnicza w Krakowie, Wydział Ogrodniczy.

NOWAK E., ADAMUS A., MICHALIK B. 1999. *Otrzymywanie podwojonych haploidów cebuli*. Materiały I Krajowej Konferencji „Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin”. IGR PAN, Poznań, 18 XI 1999: 20–22.

Słowa kluczowe: *Allium cepa*, haploidy, podwojone haploidy, gynogeneza, efektywność gynogenezy, izomeraza glukozy-6-fosforanowa (PGI)

Streszczenie

Badania nad indukcją gynogenicznych zarodków cebuli przeprowadzono na kilku odmianach wyhodowanych w firmie „SPÓJNIA”. Na pożywkę indukcyjną wyłożono 12385 pąków kwiatowych. Otrzymano 598 zarodków, z których 109 rozpoczęło spontaniczną diploidyzację.

Ploidalność otrzymanych roślin badano przy pomocy cytometru przepływowego. W celu podwojenia liczby chromosomów haploidalnych roślin zastosowano kolchicynę. W wyniku diploidyzacji uzyskano 46 podwojonych haploidów.

Efektywność gynogenezy w przypadku pąków kwiatowych, pozyskanych u roślin matecznych uprawianych w warunkach szklarniowych, wynosiła 6,11%.

GYNOGENESIS ABILITY IN ONION BREEDING AT „SPÓJNIA” Ltd., NOCHOWO

*Violetta Szulc-Sroga, Marian Pędziński, Wojciech Matuszak,
Małgorzata Majchrzak, Ewa Rubik*
„SPÓJNIA” Vegetable Plant Breeding & Seed Production Firm,
Ltd., Nochowo

Key words: *Allium cepa*, haploids, doubled haploids, gynogenesis, gynogenesis ability, glucose-6-phosphate isomerase (PGI)

Summary

Intensive research works were conducted on induction of haploid onion plants by using of gynogenesis on several breeding forms. Among 12385 flower buds placed on medium A, 598 embryos were obtained and 109 of them started the spontaneous diploidization. The ploidy level of gynogenic plants was mea-

sured by means of flow cytometry. Doubling of chromosomes in haploid plants was obtained *in vitro* with the use of colchicine. After the diploidization 46 doubled haploids were obtained. The efficiency of gynogenesis based on the flower buds grown under greenhouse condition reached 6.11%. The research is still in progress.

Mgr Violetta Szulc-Sroga

„SPÓJNIA”, Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze, Sp. z o.o.

Nochowo

ul. Lipowa 22

63-100 ŚREM