

WYKORZYSTANIE MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ DO IDENTYFIKACJI SAMOPŁODNOŚCI BURAKA CUKROWEGO

Maria Szota, Barbara Skibowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Bydgoszcz

Wstęp

W hodowli heterozyjnych odmian buraka cukrowego wykorzystywane są homozygotyczne linie rodzicielskie uzyskane przez chów wsobny.

Identyfikacja i wybór samopłodnych genotypów w praktyce hodowlanej są prowadzone na podstawie zawiązywania nasion po wymuszonym samozapyleniu roślin w izolatorach. Ze względu na występowanie w populacji buraka cukrowego w niewielkim procencie samopłodnych genotypów, konieczne jest izolowanie bardzo dużej liczby nasienników. Celem pracy było opracowanie metody wczesnej identyfikacji samopłodnych roślin, pozwalającej na wskazanie ich do izolowania.

Materiał i metoda

Przedmiotem badań i selekcji w latach 2000–2001 były materiały hodowlane IHAR, jednonasienne buraki cukrowe o różnym stopniu samozgodności. Testy na samozgodność przeprowadzono u roślin, które charakteryzowały się prawidłowym pokrojem oraz gęstym osadzeniem kwiatów na pędach.

Na początku kwitnienia wykonano w kontrolowanych warunkach sztuczne zapylenie 3–5 kwiatków 314 roślin z 8 rodzin. Po 24 godzinach od naniesienia pyłku ze świeżo otwartych kwiatów na dojrzałe znamię słupka, materiał utrwalono (alkohol etylowy, formaldehyd i kwas octowy 8:1:1). Preparaty z 3 kwiatów każdej analizowanej rośliny wykonano odrębnie pod binokulem. Słupek pocięto na trzy części, barwiono błękitem anilinowym (0,002% w buforze fosforanowym o stężeniu $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 8$) i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym delikatnie rozgniatano. Kiełkowanie pyłku na znamieniu i wzrost łagiewek pyłkowych w szyjce słupka oraz wrastanie łagiewki do zalążka obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym w świetle niebieskim przy wzbudzeniu UV (LD 410). Dokumentację fotograficzną wykonano na filmie Kodak Ektachrom 400.

Nasiona zebrane z wyselekcjonowanych w 2000 r. roślin wysiano jesienią w szklarni. Na wiosnę 2001 r. po jarowizacji, rośliny posadzono w 22 szkółkach chowu siostrzanego izolowanych konopiami. Na rośliny o prawidłowym pokroju i gęsto osadzonych kwiatach na pędach ponownie założono izolatory w celu otrzymania kolejnej generacji samozgodnych buraków.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie obserwacji przeprowadzonych w mikroskopie fluorescencyjnym, u 32 jednonasiennych buraków, po sztucznym zapyleniu stwierdzono kiełkowanie licznych ziaren pyłku na znamieniu słupka. Następnie łagiewki przerastały szybkę słupka, a po 24 godzinach łagiewka pyłkowa wrastała do zalążka (fot. 1–3). Zidentyfikowane tą metodą jako samozgodne 32 rośliny zawiązały nasiona na pędach pod izolatorem (tab. 1). Zróżnicowane zawiązywanie nasion po samozapłodnieniu świadczy o różnym stopniu samozgodności analizowanych roślin i wynika z systemu samoniezgodności gametofitowej buraka cukrowego.

Tabela 1; Table 1

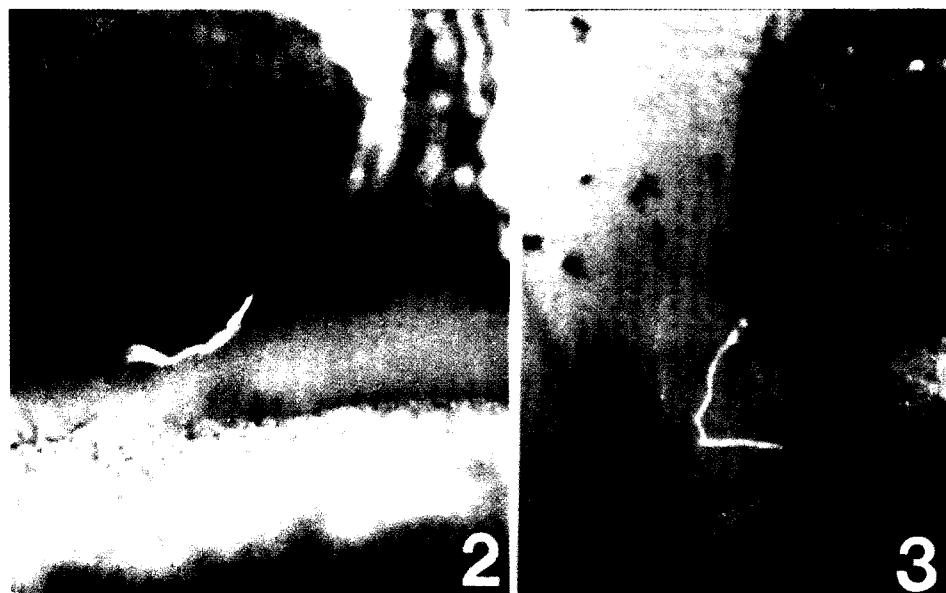
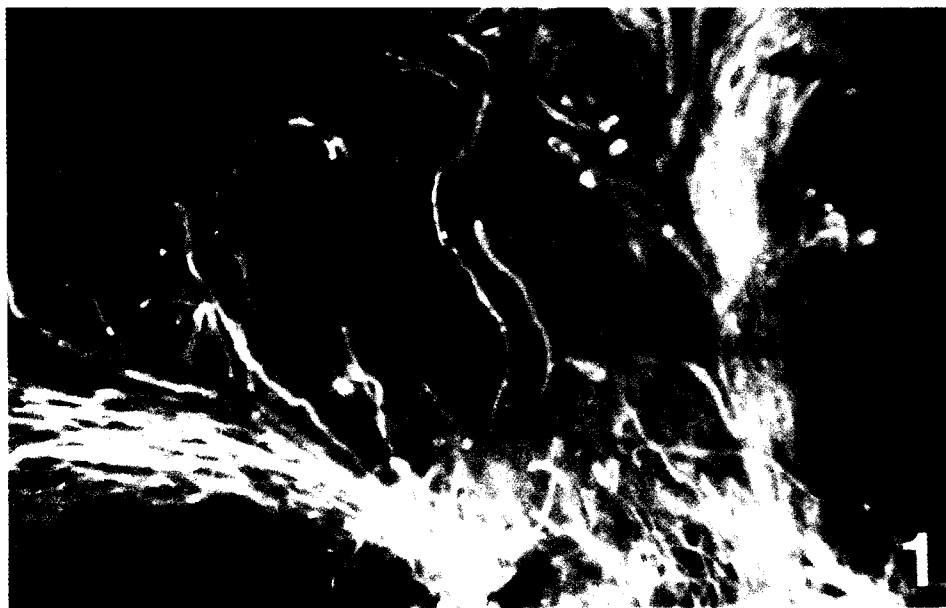
Identyfikacja samozgodnych genotypów buraka cukrowego
Identification of self-compatible genotypes of sugar beet

Rok Year	Materiał Material	Liczba roślin testowanych No. of tested plants	Liczba roślin samozgodnych No. of compatible plants	Liczba nasion na roślinę; No. of set seed per plant
2000	rodzina 1; family 1	87	14	58–400
	rodzina 2; family 2	22	1	248
	rodzina 3; family 3	86	8	66–386
	rodzina 4; family 4	21	1	102
	Σ	216	24	–
2001	rodzina 5; family 5	50	5	121–230
	rodzina 6; family 6	16	1	64
	rodzina 7; family 7	20	1	72
	rodzina 8; family 8	12	1	157
	Σ	98	8	–
	ogółem; total	314	32	–

Potomstwo wyselekcjonowanych samozgodnych buraków posadzono w 22 szkółkach chowu siostrzanego i ponownie założono izolatory na pędy nasienników. Rośliny zawiązały nasiona na pędach pod izolatorem, co świadczy o ich samozgodności, jak również że cecha ta została przekazana do następnej generacji.

Natomiast u pozostałych 282 badanych roślin, po sztucznym zapyleniu nie obserwowano wrastania łagiewki pyłkowej do zalążka. Rośliny te nie zawiązały nasion na pędach pod izolatorem, co wskazuje na ich samoniezgodność.

U buraka cukrowego, do tworzenia linii wsobnych przez samozapylenie (samopłodnych) niezbędne są genotypy o wysokim stopniu samozgodności [DALKE 1970, 1980]. W populacjach jednonasiennych buraka cukrowego występują rośliny zróżnicowane pod względem ilości nasion zawiązanych przy wymuszonym samozapyleniu. Powodowane jest to systemem samoniezgodności gametofitowej determinowanym przez 4 loci o komplementarnym współdziałaniu [LARSEN 1977a, 1977b]. Na skutek mutacji genów samoniezgodności oraz w obecności genów modyfikatorów u buraka cukrowego występują genotypy o różnym stopniu samozgodności [LUNDDQVIST i in. 1973; LARSEN 1977a; MATELSKY, WEISMANN 1978; MATELSKY, MATELSKYA 1996].



Fot. 1. Kiełkowanie pyłku na znamieniu i penetracja łągiełek w szyjce słupka (50x)
Fhot. 1. Pollen germination on stigma and tubes penetrating the pistil (50x)

Fot. 2. Łągiełka pyłkowa rosnąca w kierunku mikropyle (125x)
Fhot. 2. Tube grows directed to micropyle (125x)

Fot. 3. Łągiełka w rejonie mikropyle (125x)
Fhot. 3. Pollen tube in the region of micropyle (125x)

Warunki środowiska również wpływają na ujawnienie się cechy samozgodności u buraka przy wymuszonym samozapyleniu. Wysoka temperatura (około 35°C), susza lub nadmierna ilość opadów powodowały obniżenie zawiązywania nasion z samozapylen w izolatorach [DALKE 1970]. Autorka stwierdziła również występowanie pseudozgodności u buraka cukrowego, ponieważ cecha samozgodności u badanych genotypów nie została przekazana potomstwu. Zazwyczaj pseudozgodność ujawnia się u genotypów buraka o niskim stopniu samozgodności [DALKE 1970; LARSEN 1977a]. Natomiast niższe temperatury (10°C–13°C) w okresie kwitnienia sprzyjały dobremu zawiązywaniu nasiona przy wymuszonym samozapyleniu [BOSEMARK 1993].

Dla uzyskania linii wsobnych konieczna jest stała selekcja roślin na cechę samozgodności i dlatego podejmowane są badania nad opracowaniem efektywnej metody selekcyjnej dla buraka. Do identyfikacji samozgodności u buraka cukrowego podjęto próby wykorzystania kultur *in vitro* [HALDRUP, BRUUN 1993]. Autorzy porównali szybkość kiełkowania pyłku i wzrost łagiewek pyłkowych w szyjce słupka po 6 i 24 godz. od zapylenia w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Nie stwierdzili różnic w kiełkowaniu pyłku, co wskazuje na możliwość wykorzystania również kultur *in vitro* do selekcji samozgodnych genotypów. Metoda ta wymaga hodowli pąków kwiatowych oraz wykonania zapylenia w warunkach sterylnych.

Przedstawiona w niniejszej pracy metoda jest łatwa i zastosowana w warunkach *in vivo*, umożliwia wczesną identyfikację samopłodnych genotypów oraz wskazanie roślin do izolacji.

Wnioski

1. Opracowana metoda może być wykorzystana w warunkach *in vivo* do wczesnej identyfikacji samopłodnych genotypów w populacjach buraka cukrowego oraz w liniach O.
2. Metoda ta pozwala na wskazanie samopłodnych roślin już po dwóch dniach od zapylenia.

Literatura

- BOSEMARK N. 1993. *Genetics and breeding*, w: *The sugar beet crop*. (wyd.) Chapman & Hall. London: 71–72.
- DALKE L. 1970. *Zmienność i charakter cechy samopłodności u genetycznie jedno- i dwunasiennych buraków cukrowych*. Hod. Rośl. Aklim. Nas. 11(5): 493–505.
- DALKE L. 1980. *Samozgodność u jednonasiennego buraka cukrowego i możliwości jej wykorzystania w hodowli*. Hod. Rośl. Aklim. Nas. 24(3): 169–202.
- HALDRUP A., BRUUN L. 1993. *Self-incompatibility reactions and compatible pollen-tube growth are retained with in vitro pollinations of sugar beet, Beta vulgaris L.* Sex Plant Reprod. 6: 46–51.
- LARSEN K. 1977a. *Self-incompatibility in Beta vulgaris L. I. Four gametophic complementary S-loci in sugar beet*. Hereditas. 85: 227–248.

- LARSEN K. 1977b. *Pseudo-incompatibility in Beta vulgaris L. a quantitative character, dependent on the degree of S-gene heterozygosity*. Incompatibility Newsletter. 8: 48–51.
- LUNDDQVIST A., ŘSTERBYE U., LARSEN K., LINDE-LARSEN I. 1973. *Complex self-incompatible system in Ranunculus acris L. and Beta vulgaris L.* Hereditas. 74: 161–168.
- MALETSKY S., MALETSKAYA E. 1996. *Self-fertility and agamospermy in sugar beet, Beta vulgaris L.* Genetika 32(12): 1643–1650.
- MALETSKY S., WEISMANN N. 1978. *A population genetic analysis of self- and cross-incompatibility in sugar beet (Beta vulgaris L.)*. Theor. Appl. Genet. 52: 21–28.

Słowa kluczowe: burak cukrowy, samopłodność, samozgodność, kiełkowanie pyłku, fluorescencja

Streszczenie

Opracowano metodę wczesnej identyfikacji samopłodnych genotypów buraka cukrowego w populacji oraz w liniach O. Na początku kwitnienia buraków przeprowadzono sztuczne zapylenie i po 24 godz. materiał utrwalono. Na preparatach wykonanych odręcznie, barwionych błękitem anilinowym analizowano kiełkowanie pyłku i wzrost łągievek pyłkowych. Obserwacje przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym.

APPLICATION OF FLUORESCENT MICROSCOPY TO IDENTIFY SELF-INCOMPATIBILITY IN SUGAR BEET

Maria Szota, Barbara Skibowska

Institute of Plant Breeding and Acclimatization, Branch in Bydgoszcz

Key words: sugar beet, self-pollination, self-compatibility, pollen germination, fluorescence

Summary

An efficient method to early identification of self-compatible genotypes in the population and in O type lines of sugar beet was elaborated. Artificial pollination was conducted at the beginning of plant flowering and after 24 h the flowers were fixed. Preparations were done by hand and then stained with aniline blue. Pollen germination and the penetration of pollen tubes were analysed. Preparations were observed under fluorescent microscope.

Doc. dr hab. **Maria Szota**
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Oddział w Bydgoszczy
ul. Powstańców Wielkopolskich 10
85-090 BYDGOSZCZ