

OTRZYMYWANIE ROŚLIN HAPLOIDALNYCH U OGÓRKA POŁOWEGO W FIRMIE „SPÓJNIA” W NOCHOWIE

*Violetta Szulc-Sroga, Marian Pędziński, Arkadiusz Labrzycki, Ewa Rubik,
Małgorzata Majchrzak*

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

Wstęp

Ogórek gruntowy (*Cucumis sativus* L.) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych w uprawie warzyw i ma duże znaczenie gospodarcze. Zajmuje ok. 12% powierzchni zajętej pod uprawę warzyw. Warzywo to jest spożywane w stanie surowym i przetworzonym przez cały rok. Użytkowane są głównie odmiany mieszańcowe tego gatunku. Ogórek jest gatunkiem diploidalnym ($2x = 14$), jednorocznym i obcopolnym. Otrzymanie nowej odmiany wymaga minimum ośmiu pokoleń. Ważnym etapem w hodowli odmian mieszańcowych (heterozyjnych) jest chów wsobny prowadzący do uzyskania linii homozygotycznych [MALIĘPSZY i in. 1989].

Indukowanie haploidów i otrzymywanie linii podwojonych haploidów pozwala ograniczyć liczbę pokoleń wsobnych oraz uzyskać w ciągu około dwóch lat rośliny homozygotyczne.

Rośliny haploidalne w ogórku połowym można otrzymać przez powstawanie nasion z pominięciem procesu zapłodnienia. Stymulację rozwoju zarodka wywołuje się w tym przypadku przez zapylenie napromieniowanym pyłkiem, którego łagiewka pyłkowa kiełkuje z opóźnieniem. Jądra plemnikowe po osiągnięciu komórki jajowej nie posiadają jednak zdolności do jej zapłodnienia [FARIS 1999].

Materiał i metody

Prace nad indukowaniem haploidów w ogórku połowym rozpoczęto w „SPÓJNIA” w Nochowie, w 1999 roku. Obejmowały one trzy serie badawcze: jesienią 1999 roku oraz wiosną i jesienią 2000 roku.

Materiał roślinny (donorowy) w każdej serii stanowiły mieszańce F_1 . W pierwszym doświadczeniu użyto dwóch mieszańców: ‘Śremski F_1 ’, ‘Malta F_1 ’, a w kolejnych seriach odpowiednio 11 i 12 różnych genotypów. Rośliny donorowe ogórka w każdej serii uprawiano w optymalnych warunkach szklarniowych w okresie wiosenno-letnim. Faza kwitnienia ciepłolubnych roślin ogórka przypadała: na wiosnę (od kwietnia) i lato (do września). Formę ojcowską jednopienną w każdym przypadku wysiewano ok. dwa tygodnie wcześniej, aby w odpowiednim momencie zapewnić źródło pyłku.

Pąki kwiatowe żeńskie i męskie izolowano na dzień przed otwarciem (*anthesis*). Pąki kwiatów męskich zrywano wcześniej rano i przy użyciu tzw. bomby kobaltowej poddawano promieniowaniu gamma (^{60}Co) dawką 0,2 i 0,3 kGy. Następnie zapyłano kwiaty żeńskie napromieniowanym pyłkiem. Na jednej roślinie zapyłono napromieniowanym pyłkiem od pięciu do siedmiu kwiatów żeńskich. Owoce zbierano po 4–6 tygodniach licząc od dnia zapylenia. Nasienniki myto w wodzie z detergentem, a następnie odkażano powierzchniowo alkoholem etylowym. Kolejno, izolowano zarodki koloru mleczno-białego w stadium serca lub torpedy. Zarodki przenoszono na pożywkę E20A [SAUTON, DUMAS DE VAULX 1987].

Rośliny w różnych etapach kultury *in vitro* umieszczano w pokoju hodowlanym (fitotronie) w temperaturze 23°C oraz przy 16-godzinnym dniu.

Rozwijające się z zarodków rośliny pasażowano na pożywkę 1/2 MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] z połową składników odżywczych. Następnie namnażano wegetatywnie. Rośliny cięto na międzywęźla i umieszczono na pożywce V [MURASHIGE, SKOOG 1962] pozbawionej witamin.

Dla podwojenia liczby chromosomów prowadzono bezpośrednią regenerację. W tym celu pobierano młode liście w kształcie łódeczki (drugie od stożka wzrostu), które następnie cięto na skrawki o wielkości 1,0 mm x 1,0 mm. Eksplantaty przenoszono na pożywkę 1/7 MS (zmodyfikowana pożywka MURASHIGE i SKOOG [1962]), na której pozostawały przez dwa tygodnie bez dostępu światła. Takie postępowanie sprzyja powstawaniu kalusa, a następnie indukcji zarodków somatycznych. Zarodki te dały początek małym roślinkom (regenerantom), które pasażowano na pożywkę 1/6 MS (zmodyfikowana pożywka MURASHIGE i SKOOG [1962]).

Regeneranty przenoszono do słoików z pożywką 1/2 MS (MURASHIGE i SKOOG [1962] z połową składników odżywczych). Ploidalność oceniano przy użyciu cytometru przepływowego, na podstawie pomiaru fluorescencji emitowanej przez wcześniej wprowadzony barwnik połączony z cząsteczką DNA [BARAŃSKI 1996]. Po badaniu rośliny diploidalne były aklimatyzowane do warunków uprawy, a następnie przekazywane hodowcy. Natomiast pozostałe haploidy poddawano procesowi kolchicynowania w warunkach *in vitro* lub *in vivo* w celu podwojenia liczby chromosomów. Najczęściej stosowano dwa stężenia kolchicyny (w zależności od kondycji roślin): roztwór 0,05% lub 0,1%.

Kolchicynowanie roślin *in vitro* polega na naniesieniu kropli roztworu kolchicyny i agaru na stożek wzrostu. Zabieg ten powtarza się przez pięć kolejnych dni. Przed nałożeniem świeżej kropli pożywki, poprzednią usuwano. Kolchicynowanie *in vivo* polegało na tym, iż roślinę haploidalną zaaklimatyzowaną do warunków szklarniowych prowadzono na pędy boczne. Gdy pędy te osiągną długość około 20 cm, wycina się je, umieszcza w roztworze kolchicyny i pozostawia w ciemnym pomieszczeniu na okres 24 godzin. Następnie pędy są przesadzane do doniczek z perlitem i ukorzeniane. Po każdym zabiegu kolchicynowania pobierane są najmłodsze liście w celu zbadania ich ploidalności z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Wyniki i dyskusja

W ciągu dwóch lat pracy nad indukowaniem haploidów ogórka doświadczalnie poddano 25 genotypów, zanalizowano 1376 nasienników ogórka, wyizolowano

923 zarodki, z których 30% rozwinęło się w haploidalne rośliny. Wśród użytych genotypów zaznaczyło się duże zróżnicowanie w tworzeniu haploidalnych zarodków i powstawaniu z nich roślin.

Najwięcej zarodków otrzymano z mieszańca 'Malta F₁', średnio 2,2 zarodki z jednego owocu (przy 0,2 kGy) i 1,6 (przy 0,3 kGy) [NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1999]. Pozostałe genotypy tworzyły od 0,1 do 2,0 zarodków z jednego owocu (tab. 1, 2, 3).

Tabela 1; Table 1

Otrzymywana liczba zarodków w zależności od dawki promieniowania gamma i genotypu w sezonie jesiennym

Number of embryos obtained after using two doses of radiation

Seria Series	Genotyp Genotype	Dawka 0,2 kGy; Dose 0.2 kGy			Dawka 0,3 kGy; Dose 0.3 kGy		
		liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owocu; average number of embryos per 1 fruit	liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owo- cu; average number of embryos per 1 fruit
I Sezon jesienny 1999 rok Autumn 1999	Malta F ₁	32	68	2,2	21	33	1,6
	Śremski F ₁	21	27	1,3	25	33	1,3
	suma total	53	95	1,8	46	66	1,4

Tabela 2; Table 2

Otrzymywana liczba zarodków w zależności od dawki promieniowania gamma i genotypu w sezonie wiosennym

Number of embryos obtained after using two doses of radiation

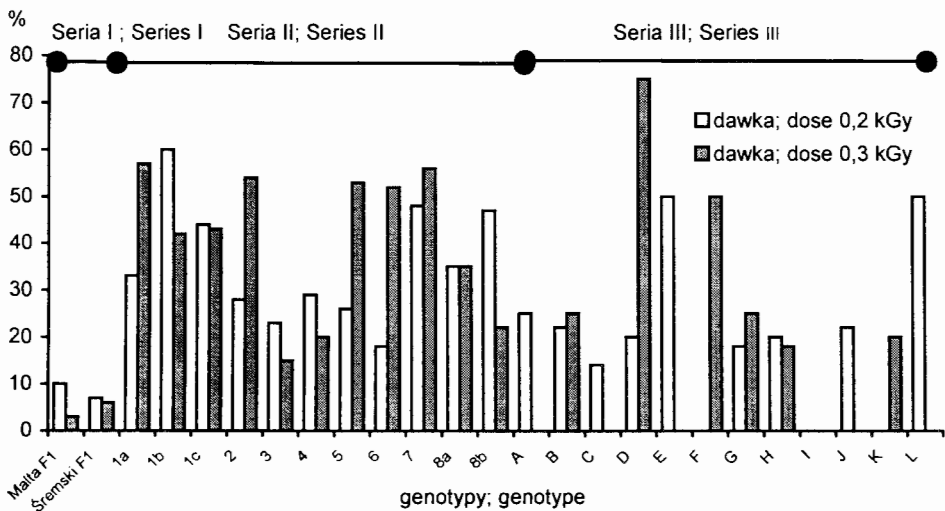
Seria Series	Genotyp Genotype	Dawka 0,2 kGy; Dose 0.2 kGy			Dawka 0,3 kGy; Dose 0.3 kGy		
		liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owocu average number of embryos per 1 fruit	liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owo- cu; average number of embryos per 1 fruit
II Sezon wiosenny 2000 rok Spring 2000	1a	34	45	1,3	28	14	0,6
	1b	23	45	2,0	22	19	0,9
	1c	20	16	0,8	28	21	0,8
	2	46	47	1,0	62	41	0,7
	3	43	47	1,1	51	27	0,5
	4	46	51	1,1	46	25	0,5
	5	51	34	0,7	54	19	0,4
	6	42	33	0,8	52	25	0,5
	7	48	25	0,5	52	27	0,5
	8a	27	17	0,6	35	26	0,7
	8b	34	15	0,4	25	9	0,4
	suma total	414	375	0,9	455	253	0,6

Tabela 3; Table 3

Otrzymywana liczba zarodków w zależności od dawki promieniowania gamma i genotypu w sezonie jesiennym

Number of embryos obtained after using two doses of radiation

Seria Series	Genotyp Genotype	Dawka 0,2 kGy; Dose 0.2 kGy			Dawka 0,3 kGy; Dose 0.3 kGy			
		liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owocu average number of embryos per 1 fruit	liczba owoców number of fruits	liczba zarodków number of embryos	liczba zarodków z jednego owocu average number of embryos per 1 fruit	
III Sezon jesienny 2000 rok Autumn 2000	A	24	8	0,3	13	1	0,1	
	B	18	9	0,5	12	8	0,7	
	C	14	7	0,5	3	1	0,3	
	D	11	10	0,9	6	4	0,7	
	E	24	4	0,2	20	3	0,2	
	F	18	1	0,1	11	2	0,2	
	G	16	11	0,7	21	4	0,2	
	H	21	5	0,2	17	11	0,6	
	I	26	7	0,3	18	6	0,3	
	J	25	9	0,4	16	9	0,6	
	K	21	1	0,1	26	10	0,4	
	L	23	2	0,1	4	1	0,3	
	suma total		241	74	0,3	167	60	0,4



Rys. 1.
Fig. 1.

Procent uzyskanych roślin haploidalnych z zarodków w trzech seriach
Percentage of haploidal plants obtained from embryos (3 series of experiment)

Dane przedstawione na rys. 1 dotyczą kolejnego etapu, jakim jest rozwój roślin z zarodków. Haploidalne zarodki genotypu I niezdolne były do regeneracji w rośliny. Najslabiej rozwijały się rośliny po dawce 0,2 kGy z obiektów 'Śremski F1' (7%), 'Malta F1' (10%), C (14%). Natomiast po dawce 0,3 kGy najmniej haploidów otrzymano u 'Malta F1' (3%), 'Śremski F1' (6%) oraz u obiektów 3 (15%) i H (18%). Najsilniejszy rozwój roślin po dawce 0,2 kGy wystąpił u genotypów: 1b (60%), E (50%), L (50%). Po dawce 0,3 kGy najwięcej roślin haploidalnych otrzymano u obiektów: D (75%), 1a (57%), 7 (57%).

Średni poziom regeneracji z zarodków haploidalnych mieścił się w granicach od 7 do 13%. Najwięcej powstających roślin zanotowano u genotypu 1b – 55% oraz F, gdzie zregenerowało 50% roślin (rys. 1).

W rezultacie z rozwijających się zarodków uzyskano 271 haploidalnych roślin. W celu podwojenia liczby chromosomów pobrano z tych roślin 427 liści, z których zregenerowało 439 roślin regenerantów (tab. 4, 5, 6).

Tabela 4; Table 4

Przydatność do regeneracji bezpośredniej. Seria I, sezon jesienny 1999 r.
Usefulness to direct regeneration. Series I, Autumn 1999

Genotyp Genotype	Dawka promieniowania Dose of radiation (kGy)	Liczba eksplantów wtórnych No. of secondary explants	Liczba otrzymanych regenerantów No. of regenerants	Liczba roślin z jednego eksplantatu No. of plants per 1 explant
Malta F1	0,2	38	57	1,5
	0,3	18	0	0
Śremski F1	0,3	9	18	2,0
Suma; Total	0,2	38	57	1,5
	0,3	27	18	0,67

Tabela 5; Table 5

Przydatność do regeneracji bezpośredniej. Seria II, sezon wiosenny 2000 r.
Usefulness to direct regeneration. Series II, Spring 2000

Genotypy mieszańców Genotype of varieties	Dawka promieniowania Dose of radiation (kGy)	Liczba eksplantów wtórnych; No. of secondary explants	Liczba otrzymanych regenerantów No. of regenerants	Liczba roślin z jednego eksplantatu; No. of plants per 1 explant
1	2	3	4	5
1a	0,2	25	55	2,2
	0,3	33	11	0,3
1b	0,2	27	15	0,6
	0,3	3	1	0,3
1c	0,2	26	20	0,8
	0,3	31	66	2,1
2	0,2	0	0	0
	0,3	13	9	0,7
3	0,2	19	48	2,5
	0,3	5	0	0

ciąg dalszy tabeli 5; Table 5 – continued

1	2	3	4	5
4	0,2	0	0	0
	0,3	5	11	2,2
5	0,2	35	17	0,5
	0,3	6	0	0
6	0,2	2	0	0
	0,3	22	14	0,6
7	0,2	2	0	0
	0,3	12	9	0,8
8a	0,2	0	0	0
	0,3	14	9	0,6
8b	0,2	0	0	0
	0,3	0	0	0
Średnia Average	0,2	136	155	1,1
	0,3	144	130	0,9

Tabela 6; Table 6

Przydatność do regeneracji bezpośredniej.
Seria III, sezon jesienny 2000 r., dawka 0,3 kGy
Usefulness to direct regeneration.
Series III, Autumn 2000, dose 0.3 kGy

Genotypy mieszańców Genotype of varieties	Dawka promieniowania Dose of radiation (kGy)	Liczba eksplantów wrotnych Number of secondary explants	Liczba otrzymanych regenerantów Number of regenerants	Liczba roślin z jedno- go eksplantatu Number of plants obtained from 1 explant
A	0,2	13	6	0,5
B	0,2	6	0	0
C	0,2	3	5	1,7
D	0,3	4	4	1,0
E	0,2	3	2	0,7
F	0,3	13	8	0,6
G	0,3	9	15	1,7
	0,2	7	4	0,6
H	0,2	2	0	0
	0,3	14	28	2,0
J	0,2	5	2	0,4
K	0,3	3	2	0,7
L	0,2	1	3	3,0
Średnia Average	0,2	39	22	0,6
	0,3	43	57	1,3

U roślin haploidalnych z serii I podjęto próbę podwajania liczby chromosomów *in vivo*, stosując roztwór kolchicyny o stężeniu 0,05%. Działaniu roztworu poddano 40 pędów bocznych, pochodzących z 'Malty F1' i 'Śremskiego F1'. Przeżywalność roślin wyniosła 12%. Po badaniu ploidalności wszystkie rośliny okazały się haploidami, czyli kolchicynowanie było nieskuteczne.

W wyniku regeneracji bezpośredniej (po dawce 0,2 i 0,3 kGy) uzyskano średnio z jednego eksplantatu liściowego jednego regeneranta. Nie zauważono, by dawka promieniowania wpłynęła na ilość otrzymanych regenerantów.

Rośliny, które zregenerowały z tkanki kalusowej, poddano analizie cytometrycznej. Łącznie przebadano 117 roślin, z czego 55 okazało się podwojonymi haploidami (43 rośliny z cyklu wiosennego 2000 roku i 12 roślin z cyklu jesiennego 2000 roku). Podwojone haploidy pochodziły od dziewięciu genotypów: 1a (0,2 i 0,3 kGy), 1b (0,2 kGy), 1c (0,3 kGy), 3 (0,2 kGy), 4 (0,3 kGy), 8a (0,3 kGy), C (0,2 kGy), G (0,3 kGy), H (0,3 kGy).

Rośliny z serii II i III, których genomy nie uległy podwojeniu poddano kolchicynowaniu „*ex vitro*”. Ponieważ był to materiał w bardzo dobrej kondycji, zastosowano 0,1% roztwór kolchicyny. Zabiegowi kolchicynowania poddano:

- 125 pędów bocznych z roślin pochodzących z cyklu wiosennego 2000 roku, z czego przeżyły 92 rośliny,
- 50 pędów bocznych z roślin, z cyklu jesiennego 2000 roku, z czego przeżyło 26 roślin.

Analiza ploidalności wykazała, że na 118 przebadanych roślin – 42 to podwojone haploidy, 8 roślin okazało się miksaploidami, natomiast u 68 roślin genom nie uległ podwojeniu.

Rośliny będące podwojonymi haploidami przekazano hodowcy. W wyniku chowu wsobnego z cyklu wiosennego 2000 r. uzyskano 29 nasienników pochodzących od genotypów: 1a, 1c, 8a oraz osiem nasienników z genotypu G cyklu jesiennego 2000 r. Prace nad seriami wiosenną i jesienną są nadal kontynuowane. Dotychczas udało się uzyskać nasiona z pojedynków otrzymanych metodą podważania haploidów. W materiałach tych pokładamy nadzieję na podniesienie tolerancji na choroby, szczególnie na mączniaka rzekomego (*Pseudoperonospora cubensis*), a tym samym sformowanie nowych mieszańców o wysokiej wartości użytkowej i gospodarczej.

Prace badawcze nad indukowaniem haploidów z wybranych mieszańców ogórka prowadzone były w SGGW w Warszawie przez zespół Katarzyny Niemirowicz-Szczytt. Przeprowadzono trzy cykle badawcze (jesień 1998 oraz wiosna i jesień 1999) z mieszciami: ‘Polan F1’, ‘Krak F1’, ‘Izyd F1’ i ‘Frykas F1’. Otrzymało się średnio od 0,5–1,7 zarodków z jednego owocu, natomiast regeneracja zarodków w haploidalne rośliny mieściła się w granicach od 6–42% [NIEMIROWICZ-SZCZYTT i in. 1999].

W toku naszych badań osiągnęliśmy zbliżone wyniki, średnia liczba zarodków z jednego owocu wynosiła 0,4–1,6, natomiast 7–55% zarodków wykształciło haploidalne rośliny.

Badania Niemirowicz-Szczytt dowodzą również, że sezon jesienny jest korzystniejszy niż wiosenny dla formowania zarodków i powstawania z nich roślin. Prawdopodobnie ta nie zaznaczyła się w przypadku niniejszych badań, ale należy podkreślić, że liczba prowadzonych doświadczeń nie była wysoka.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania nie wykazały znaczącego wpływu dawki promieniowania gamma na ilość wytworzonych przez roślinę zarodków. Zaznaczyła

- się tylko niewielka różnica w doświadczeniu 1 i 2 na korzyść promieniowania w dawce 0,2 kGy, jednak wymaga to sprawdzenia na większej ilości prób.
2. Odnotowano minimalną przewagę w rozwoju haploidalnych roślin z zarodków po dawce promieniowania 0,3 kGy (32%), w stosunku do mniejszej dawki napromieniowania. Przewaga może być spowodowana tym, że ilość zarodków po dawce promieniowania 0,3 kGy jest zazwyczaj mniejsza, ale są silniejsze i lepiej rozwijają się w rośliny.
 3. Wprowadzenie do hodowli metod polegających na wyprowadzeniu linii podwojonych haploidów (DH) techniką *in vitro* może przyczynić się do skrócenia czasu potrzebnego do wyhodowania nowej odmiany.

Literatura

- BARAŃSKI R. 1996. *Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin*. Druk, Kraków: 50–87.
- FARIS N.M. 1999. *Wybrane aspekty biotechnologii haploidów ogórka (Cucumis sativus L.)*. Autoreferat pracy doktorskiej. SGGW, Warszawa.
- MALEPSZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI Z. 1989. *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. PWN, Warszawa: 151–218.
- MURASHIGE T., SKOOG E. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. *Physiol Plant* 15: 473–497.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. 1999. *Sprawozdanie z przebiegu realizacji pracy badawczo-wdrożeniowej za okres VIII–XII 1999. Indukowanie i otrzymywanie linii DH z wybranych mieszańców ogórka*.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., FEDOROWICZ O., GALECKA T., KORZENIOWSKA A., SZTANGRET J. 1999. *Indukowanie haploidów i otrzymywanie linii DH z wybranych mieszańców ogórka*. I Krajowa Konferencja „Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin”. Streszczenia. IGR PAN, Poznań, 18 XI 1999 : 19.
- SAUTON A., DUMAS DE VAULX R. 1987. *Obteintion de plantes haploides chez le melon (Cucumis melo L.) par gynogenese induite par du pollen irradie*. *Agronomie*: 141–148.

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus*, haploid, kultury zarodków, podwojone haploidy

Streszczenie

Prace nad indukowaniem haploidów w ogórku polowym rozpoczęto w 1999 roku. Obejmowały one trzy serie badawcze, a w nich 25 genotypów. Pąki kwiatów męskich zrywano i poddawano działaniu promieniowania gamma dawką 0,2 kGy i 0,3 kGy.

Spośród 923 wyizolowanych haploidalnych zarodków 30% podjęto regenerację. Poprzez regenerację bezpośrednią jak również przy użyciu kolchicyny otrzymano 98 podwojonych haploidów. Badania trwają nadal.

INDUCTION OF HAPLOID CUCUMBER PLANTS
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: *Cucumis sativus*, haploids, embryo cultivar, doubled haploids, resistance

Summary

Research works on induction of haploid cucumber plants have been carried out since 1999 in 3 experimental series with the use 25 genotypes. Every male flower has been fertilized by gamma-irradiated pollen. The doses of radiation were 0.2 kGy and 0.3 kGy, respectively. From 923 haploid embryos isolated on Petri dishes, 30% started the regeneration. By means of direct regeneration and also using colchicine treatment, 98 doubled haploids were obtained. The research is still continued.

Mgr Violetta **Szulc-Sroga**

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

Nochowo

ul. Lipowa 22

63-100 ŚREM