

OCENA SAMONIEZGODNOŚCI U KAPUSTY GŁOWIASTEJ (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) METODĄ FLUORESCENCYJNĄ

*Maria Klein*¹, *Franciszek Dubert*², *Lucyna Samek*¹, *Iwona Żur*²,
*Halina Waligórska*²

¹ Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

² Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie

Wstęp

Samoniezgodność homomorficzna jest genetycznie uwarunkowanym mechanizmem zabezpieczającym rośliny przed samozapłodnieniem. Pozwala on selekcjonować pyłek padający na znamię słupka i hamować kiełkowanie pyłku o niewłaściwym genotypie, nie dopuszczając do zapłodnienia. W ten sposób preferowane jest krzyżowe zapłodnienie i ciągła wymiana alleli pomiędzy osobnikami tego samego gatunku. U *Cruciferae*, a także u 5 innych rodzin (*Compositae*, *Convolvulaceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae* i *Sterculiaceae*) występuje samoniezgodność sporofityczna, w której fenotyp pyłku determinowany jest przez diploidalny genom rośliny macierzystej. Pyłek ujawnia zatem ekspresję obydwu alleli genów samoniezgodności.

Od szeregu lat prowadzone są badania nad interakcją pyłek – znamię słupka w celu zrozumienia mechanizmu rozpoznawania i odrzucania niezgodnego pyłku. Najwięcej informacji na ten temat uzyskano u *Brassica oleracea* i *Brassica campestris* [BEDNARSKA 1992]. W znamieniu słupka zidentyfikowano obecność dwóch białek S: sekrecyjnej glikoproteiny oraz transbłonowej kinazy serynowo-treoninowej, zaangażowanych w proces samoniezgodności. Białka te współdziałają w odbieraniu sygnału z pyłku i przenoszeniu informacji do komórek wyrostkowych znamienia, w których zachodzi rozpoznanie i odrzucenie niezgodnego pyłku [KRZYWICKA, KOWALCZYK 1998]. Synteza białek S rozpoczyna się w słupku najczęściej na 2–3 dni przed otwarciem się kwiatu, osiągając najwyższy poziom na początku pylenia. Po zapyleniu roślin w otwartym kwiecie odrzucenie niezgodnego pyłku jest dość szybkie i odbywa się na powierzchni znamienia. Pyłek nie ulega adhezji i nie kiełkuje, albo kiełkująca łagiewka nie przenika przez papille znamienia. W takich przypadkach obserwuje się wystąpienie reakcji kalozowej, czyli syntezy kalozy na wierzchołku łagiewki pyłkowej oraz w ścianie wyrostków znamienia kontaktujących się z niezgodnym pyłkiem [ROBERTS i in. 1984].

Wymienione białka kodowane są przez geny: SLG (S-locus glycoprotein [NASRALLAH i in. 1987]) i SRK (S-locus receptor kinase [STEIN i in. 1991]), leżące w bliskiej odległości w obrębie pojedynczego lecz o kompleksowej strukturze molekularnej locusa S [BOYES, NASRALLAH 1993; CABRILLAC i in. 1999]. Obok wymienionych genów zidentyfikowano jeszcze gen SLA (S-locus anther [BOYES, NASRALLAH 1995]), przypuszcza się także istnienie innych genów zaangażowanych w proces samonieczgodności. U *Brassica oleracea* opisano wiele allelicznych form locusa S, wyróżniając około 60 haplotypów [OCKENDON 1975; BRACE i in. 1994]. W materiałach hodowlanych stwierdza się w związku z tym zróżnicowane natężenie samonieczgodności u różnych linii.

Zjawisko samonieczgodności jest wykorzystywane w hodowli kapusty do tworzenia mieszańców heterozygnych, które otrzymuje się po skrzyżowaniu odpowiednio wyselekcjonowanych linii rodzicielskich [HOSER-KRAUSE 1968, 1972]. Linie te powinny posiadać stabilnie działający system samonieczgodności. Geny warunkujące tę cechę wykazują jednak pewną labilność, zależną między innymi od genotypu rośliny i czynników środowiskowych. Prowadzi to do pojawienia się wśród mieszańców także roślin o fenotypie linii matecznej, co dyskwalifikuje uzyskane nasiona. W hodowli kapusty konieczna jest więc kontrola samonieczgodności u linii wytypowanych do tworzenia mieszańców. Jest to ważne, zwłaszcza gdy rośliny rosną w zróżnicowanych warunkach klimatycznych, mogących mieć wpływ na częściowe przełamywanie samonieczgodności. Ocenę można wykonywać różnymi metodami (biologiczną, biochemiczną i molekularną), każda z nich ma jednak pewne ograniczenia [RUFFIO-CHÂBLE 1998]. Stosowana jest także metoda fluorescencyjna, która okazała się przydatna w testowaniu linii kalafiora [DYKI 1978; RUFFIO-CHÂBLE 1998].

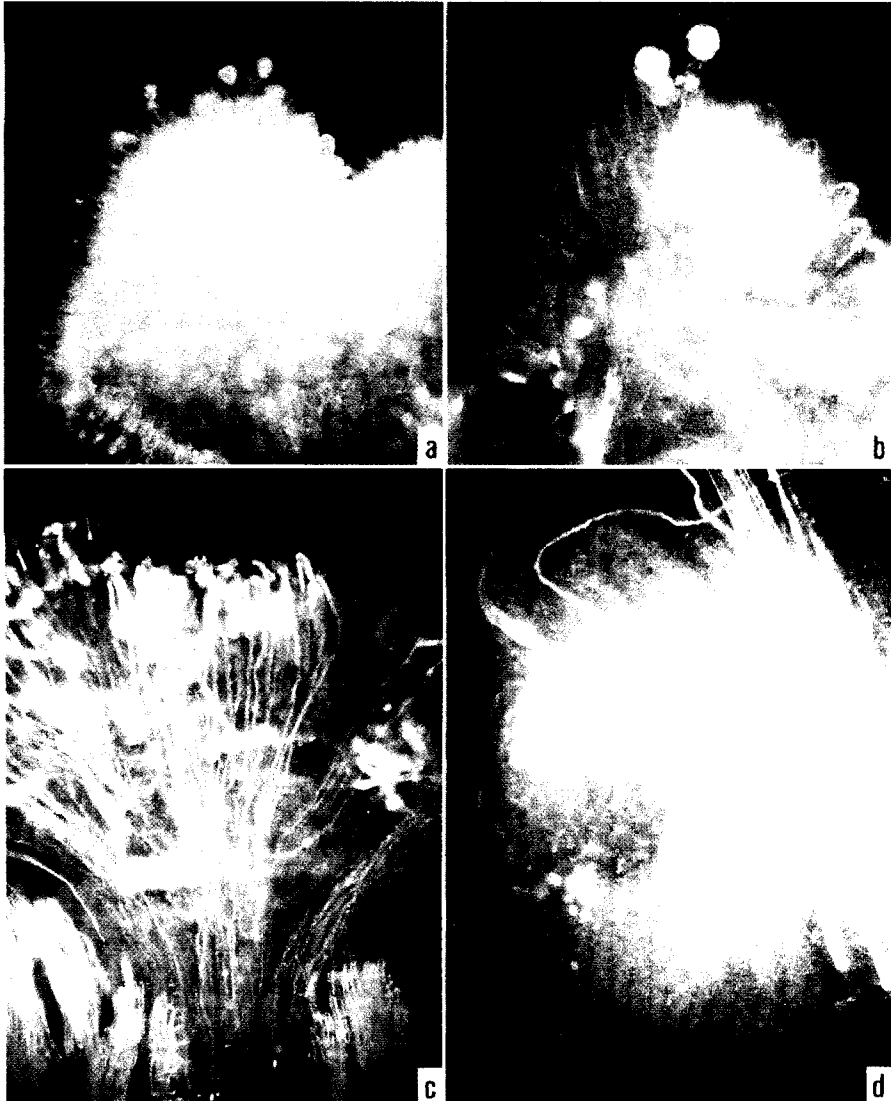
Celem niniejszej pracy była ocena przydatności metody fluorescencyjnej do szybkiej analizy stabilności cechy samonieczgodności u linii hodowlanych kapusty głowiastej białej.

Materiał i metody

Do badań wytypowano 10 linii hodowlanych kapusty głowiastej białej, uzyskanych z Krakowskiej Hodowli i Nasiennictwa Ogrodniczego „Polan” Sp. z o.o. Pędy kwiatostanowe otrzymano na drodze uprawy systemem główkowym. Rośliny po wejściu w fazę rozwoju generatywnego zostały umieszczone w komorach fitotronowych w temperaturze 12 lub 23°C oraz wilgotności względnej powietrza 60 lub 90%. Rośliny rosły na długim 16-godz. dniu przy doświetlaniu lampami metalohalogenkowymi (moc lamp 9,6 kW na komorę). Zapylenia wsobne wykonywano zarówno w otwartych kwiatach, jak również w pąkach kwiatowych na 2–3 dni przed ich otwarciem. Słupki do analizy pobierano po 24 godzinach od zapylenia. Macerowano je w 1 mol NaOH·dm⁻³ w temperaturze 37°C przez okres od 2–4 godz. oraz barwiono w błękitcie anilinowym (100 mg błękitu anilinowego rozpuszczonego w 100 ml buforu K₃PO₄ o pH 7,2–7,4) przez 24 godz. Po wypłukaniu w buforze fosforanowym słupki rozgniatano w kropli gliceryny. Obserwacje preparatów przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym typu Jenalumar (prod. Zeiss) z zastosowaniem promieniowania wzbudzającego o długości fali 360 nm.

Wyniki i dyskusja

Samoniezgodność u badanych linii kapusty zależała głównie od genotypu, a mechanizm odrzucania niezgodnego pyłku polegał przede wszystkim na braku



Rys. 1. Metoda fluorescencyjna w badaniach nad samoniezgodnością u *Brassica oleracea*: a) brak przytwierdzenia się ziaren pyłku do znamienia słupka po zapyleniu w otwartym kwiecie, b) odpowiedź kalozowa, c) łagiewki pyłkowe penetrujące słupek po zapyleniu w pąku, d) łagiewka pyłkowa docierająca do zalążni

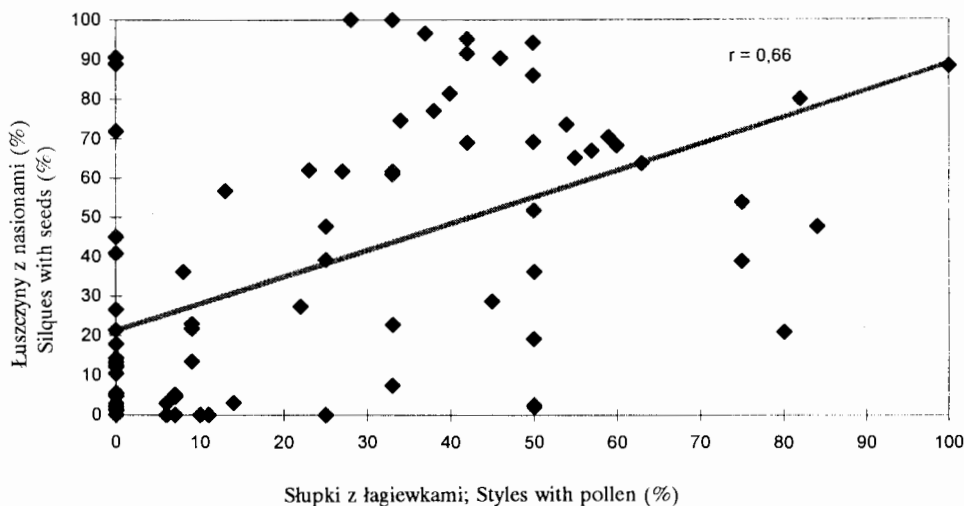
Fig. 1. Fluorescent method to examination of self-incompatibility in *Brassica oleracea*: a) few pollen grains on stigma after self-pollination of flower, b) the callose response in pollen tube, c) pollen tubes penetrating pistil after self-pollination of flower bud, d) pollen tube grows into ovule

Tabela 1; Table 1

Liczba słupków (%) wykazujących obecność łagiewek pyłkowych po samozapyleniu otwartych kwiatów badanych linii kapusty głowiastej
Percentage of styles containing pollen tubes following incompatible open flower self-pollination of ten examined cabbage lines

Linie Lines	Temperatura powietrza; Air temperature							
	12°C				23°C			
	Wilgotność powietrza; Air relative humidity				Wilgotność powietrza; Air relative humidity			
	60%		90%		60%		90%	
	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes
1	8	0	16	0	16	0	15	7
2	16	0	16	7	17	0	16	0
3	20	0	15	0	18	6	15	11
4	16	0	16	0	16	0	16	0
5	24	54	8	25	15	14	16	57
6	16	0	15	0	16	0	16	6
7	16	27	15	60	16	0	16	25
8	8	50	14	9	15	10	16	0
9	16	13	15	0	16	33	16	23
10	16	7	15	0	8	0	-	-

przytwierdzania się ziaren pyłku do papilli pokrywających znamię słupka, pomimo obfitego zapylenia (rys. 1a). U części roślin obserwowano także odpowiedź kalozową, czyli syntezę kalozy na wierzchołku łagiewki pyłkowej i w ścianie papilli (rys. 1b). Wśród 10 linii tylko jedna wykazywała całkowitą stabilność we wszystkich zastosowanych kombinacjach temperatury i wilgotności powietrza (tab. 1). U 5 linii przełamywanie samoniezgodności obserwowano w niewielkim stopniu – łagiewki były obecne w 3–11% słupków, przy czym liczba łagiewek pyłkowych w poszczególnych słupkach wahała się od 5 do 15. U pozostałych 4 linii stwierdzono wyraźną labilność tej cechy, przy czym warunki wzrostu (temperatura i wilgotność powietrza) w różny sposób wpływały na poszczególne genotypy. Wyniki uzyskane w metodzie fluorescencyjnej były w dużym stopniu zbieżne z danymi otrzymanymi na podstawie metody biologicznej, polegającej na obserwacji wiązania nasion (współczynnik korelacji $r = 0,66$; rys. 2). Przewaga metody fluorescencyjnej polega na znacznym skróceniu czasu uzyskiwania wyników (z ok. 60 dni do ok. 48 godzin) oraz unikaniu wpływu czynników środowiskowych (susza, zbyt wysoka lub niska temperatura, choroby), które w znacznym stopniu mogą modyfikować plonowanie roślin.



Rys. 2. Porównanie dwóch metod określania samoniezgodności 10 linii hodowlanych kapusty: metody fluorescencyjnej – procentu słupków zawierających łagiewki pyłkowe oraz metody biologicznej – procentu łuszczyzn zawierających nasiona. Rośliny rosły w temp. 12 i 23°C oraz przy wilgotnościach powietrza 60 i 90%

Fig. 2. Comparison of two methods of the self-incompatibility estimation in 10 breeding lines of white cabbage: the fluorescent method based on the measurements of percentage of both styles with pollen tubes and siliques containing seeds. The plants were grown at 12 & 23°C and at air relative humidity 60 & 90%

Po zapyleniach w pąku (kiedy geny samoniezgodności jeszcze nie funkcjonują) obserwowano u większości genotypów wysoką liczbę łagiewek penetrujących słupki (rys. 1c) i docierających do zalążków (rys. 1d), przy czym niższa temperatura (12°C) była efektywniejsza dla uzyskania większej liczby nasion, mimo że łagiewki pyłkowe rosły wolniej (hipoteza), tab. 2. Na uwagę zasługuje fakt, że li-

Tabela 2; Table 2

Liczba słupków (%) wykazujących obecność łagiewek pyłkowych po samozapyleniu zamkniętych pąków kwiatowych badanych linii kapusty głowiastej

Percentage of styles containing pollen tubes following incompatible green bud self-pollination of ten examined cabbage lines

Linie Lines	Temperatura powietrza; Air temperature							
	12°C				23°C			
	wilgotność powietrza; air relative humidity				wilgotność powietrza; air relative humidity			
	60%		90%		60%		90%	
	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes	liczba zapylnych słupków; number of pollinated styles	słupki (%) z łagiewkami w zalążni; styles (%) containing pollen tubes
1	8	50	15	34	14	33	16	50
2	15	9	13	8	15	45	16	0
3	16	33	16	0	16	33	16	9
4	16	46	16	25	16	75	16	63
5	24	42	8	0	16	22	16	75
6	16	33	16	42	16	50	17	84
7	16	50	16	37	16	50	7	50
8	8	40	16	55	16	80	16	59
9	16	28	16	0	16	82	15	50
10	17	38	16	42	8	100	-	-

nia stabilna pod względem samoniezgodności bardzo dobrze wiązała nasiona po zapyleniu w pąku. Może być więc wartościowym genotypem do hodowli heterozyjnej. Zastosowana metoda okazała się przydatna do szybkiej oceny stabilności danego genotypu oraz do prognozowania efektywności zapyleń w pąku.

Literatura

- BEDNARSKA E. 1992. *Interakcje międzykomórkowe podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych*. Postępy Biologii Komórki 19: 293–309.
- BOYES D.C., NASRALLAH J.B. 1993. *Physical linkage of the SLG and SRK genes at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea*. Mol. Genet. 236: 369–373.
- BOYES D.C., NASRALLAH J.B. 1995. *An anther-specific gene encoded by an S locus haplotype of Brassica produces complementary and differentially regulated transcript*. Plant Cell 7: 1283–1294.
- BRACE J., KING G.J., OCKENDON D.J. 1994. *A molecular approach to the identification of S-alleles in Brassica oleracea*. Sex. Plant. Reprod. 7: 203–208.
- CABRILLAC D., DELORME V., GARIN J., RUFFIO-CHÂBLE V., GIRANTON J.-L., DUMAS C., GAUDE T., COCK J.M. 1999. *The S₁₅ self-incompatibility haplotype in Brassica oleracea includes three S gene family members expressed in stigmas*. The Plant Cell 11: 971–986.
- DYKI B. 1978. *Zastosowanie metody fluorescencyjnej do badania samoniezgodności linii hodowlanych kalafiorów*. Biuletyn Warzywnicy 21: 267–271.
- HOSER-KRAUSE J. 1968. *Samoniezgodność u roślin krzyżowych i wykorzystanie jej w hodowli heterozyjnej*. Postępy Nauk Rolniczych 4: 47–60.
- HOSER-KRAUSE J. 1972. *Badania nad otrzymaniem mieszańców heterozyjnych kapusty głowiastej wczesnej*. Biuletyn Warzywnicy 19: 219–225.
- KRZYWICKA E., KOWALCZYK S. 1998. *Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegające samozapyleniu roślin okrytonasiennych*. Postępy Biologii Komórki 25(1): 76–93.
- NASRALLAH J.B., KAO T., CHEN C., GOLDBERG M.L., NASRALLAH M.E. 1987. *Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of S-locus of Brassica oleracea*. Nature 326: 617–619.
- OCKENDON D.J. 1975. *The S-allele collection of Brassica oleracea*. Incompatibility Newsl. 5: 82–84.
- ROBERTS I.N., HARROD G., DICKINSON H. 1984. *Pollen-stigma interaction in Brassica oleracea L. I. Ultrastructurae and physiology of the stigmatic papilla cells*. J. Cell Sci. 66: 241–253.
- RUFFIO-CHÂBLE V. 1998. *Complexity of self-incompatibility phenotype in Brassica: its measure and some thoughts about its genetic control*. Acta Horticulturae 459: 281–288.
- STEIN J.C., HOWLETT B., BOYES D.C., NASRALLAH M.E., NASRALLAH J.B. 1991. *Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8816–8820.

Słowa kluczowe: *Brassica oleracea*, samoniezgodność, metoda fluorescencyjna

Streszczenie

Zastosowano metodę fluorescencyjną do oceny stabilności cechy samoniezgodności u 10 linii hodowlanych kapusty głowiastej białej. Stwierdzono, że zarówno genotyp, jak i warunki termiczne (12, 23°C) i wilgotnościowe (60, 90%) w czasie kwitnienia i zapyłania roślin wpływały na ekspresję tej cechy. Tylko jedna z badanych linii okazała się całkowicie stabilna, u 5 następowało przełamywanie tej cechy w małym stopniu, natomiast 4 linie okazały się labilne. Zapylenia wykonane w fazie zamkniętych pąków kwiatowych u części linii były mało efektywne i zróżnicowane w zależności od temperatury i wilgotności powietrza. Metoda fluorescencyjna okazała się szybkim i stosunkowo łatwym sposobem testowania linii hodowlanych kapusty głowiastej białej.

FLUORESCENCE TECHNIQUE TO EXAMINATION OF SELF-INCOMPATIBILITY IN CABBAGE

(*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Maria Klein¹, Franciszek Dubert², Lucyna Samek¹, Iwona Żur²,
Halina Waligórska²

¹ Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,
Agricultural University, Kraków

² Department of Plant Physiology Polish Academy of Sciences, Kraków

Key words: *Brassica oleracea* (var. *capitata*), self-incompatibility, fluorescence technique

Summary

Fluorescence technique was used for quantifying the level of self-incompatibility of ten white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) lines. Both, the genotype and environmental factors (temperature: 12, 23°C and relative humidity: 60, 90% during flowering and pollination) influenced the expression of self-incompatibility. Among examined plants, we identified only one high and consistent self-incompatible line. Five lines overcame the self-incompatibility barrier at low frequency. Four others were labile. Green buds pollination was not effective in the case of some lines and highly affected by temperature/relative humidity conditions. Fluorescence technique proved a fast and relatively easy method of testing self-incompatibility response in cabbage.

Prof. dr hab. Maria **Klein**
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
al. 29 Listopada 54
31-425 KRAKÓW
e-mail: mklein@ogr.ar.krakow.pl