

Wacław Orczyk, Anna Oleksiak, Anna Nadolska-Orczyk
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Mieszzańce cytoplazmatyczne rzepaku — selekcja roślin męskosterylnych z podwyższoną w stosunku do CMS *ogura* zawartością chlorofilu

Cytoplasmic hybrids of rapeseed — selection of male sterile plants with enhanced, compared with CMS *ogura*, chlorophyll content

Badano potomstwo generatywne roślin zregenerowanych po fuzji protoplastów izolowanych z linii męskosterylnej (CMS *ogura*) i odmiany Bolko (rośliny męskopłodne). Analizę zawartości chlorofilu przeprowadzono u 1054 roślin pochodzących od 39 roślin matecznych. Wszystkie rośliny (analizowane i kontrolne) przed pomiarami chlorofilu były poddane przechłodzeniu przez 4 tygodnie w 4°C. Spośród testowanych roślin wybrano 54 rośliny mieszańcowe, charakteryzujące się znacznie wyższą niż średnia dla CMS zawartością chlorofilu w warunkach niskiej temperatury i budową kwiatów typu CMS. Najwyższe zawartości chlorofilu (przekraczające maksymalną zawartość chlorofilu u CMS) uzyskano u 12 roślin pochodzących z 10 roślin matecznych. Wszystkie miały kwiaty typu CMS oraz wytwarzały cztery, dwa lub nie wytwarzały miodników.

Progeny of plants regenerated after fusion of protoplasts isolated from male sterile (CMS *ogura*) line and cultivar Bolko has been analysed for chlorophyll content, type of flowers (male sterile vs. male fertile) number of nectaries and the nectar production. All plants were treated with low temperature (4°C) four weeks prior to chlorophyll analysis. Chlorophyll content determined in 1054 plants (derived from 39 plants R₁) was the basis for selection of 54 recombinants. All those plants had chlorophyll content much higher than average for CMS as well as male sterile type of flowers. Twelve plants (derived from 10 independent mother plants) exceeded upper level of chlorophyll in CMS and developed male sterile type of flowers (degenerated anthers) with two, four or none nectaries.

Wstęp

U rzepaku znanych jest kilka systemów męskiej sterylności. Istotnymi cechami decydującymi o przydatności takiego systemu w programie hodowli odmian heterozyjnych jest stabilność męskiej niepłodności oraz dostępność form restorujących i dopełniających. Wszystkie te podstawowe wymagania spełnia typ *ogura* cytoplazmatycznej męskiej sterylności (Bartkowiak-Broda 1991). Rośliny tego typu są mieszańcami alloplazmatycznymi *Raphanus sativus* (męskoniepłodna

cytoplazma) i *Brassica napus* (jądrowy genom rzepaku). Negatywną cechą istotnie ograniczającą przydatność tego systemu są deficyjne chlorofilowe, szczególnie wyraźnie widoczne w warunkach obniżonej temperatury. Dodatkowo, formy męskosterylne mają zredukowaną liczbę miodników i obniżone wydzielanie nektaru. Cechy te pośrednio, negatywnie wpływają na produktywność roślin. Skorygowanie ich, a przede wszystkim usunięcie deficyjności chlorofilowych, okazało się możliwe przez fuzję protoplastów roślin CMS i roślin męskopłodnych (Pelletier i in. 1983).

Celem pracy było uzyskanie somatycznych rekombinantów cytoplazmatycznych łączących cechę męskiej niepłodności ze zdolnością do normalnego rozwoju chloroplastów.

Material i metody

W badaniach użyto roślin zregenerowanych po fuzji protoplastów linii CMS *ogura* z protoplastami odmiany rzepaku ozimego Bolko oraz potomstwa tych roślin. Mierzono zawartość chlorofilu w liściach, opisywano ich kolor, typ kwiatów, liczbę miodników i szacowano ilość wydzielanego nektaru. Wyniki pomiarów chlorofilu, ocenę wizualną liści oraz opis pozostałych cech odnoszono do rosnących w tych samych warunkach roślin kontrolnych (CMS *ogura* i odmiana Bolko). Przedstawione wyniki zebrano dla roślin zregenerowanych z tych fuzji, gdzie komponentem decydującym o regeneracji były protoplasty linii CMS. Oznaczało to, że zdecydowana większość zregenerowanych roślin była typu CMS (męskopłodne kwiaty i zaburzona synteza chlorofilu) i ich selekcję prowadzono w kierunku zwiększonej zawartości chlorofilu.

Chlorofil mierzono według zmodyfikowanej metody Moran i Porath (1980). Z najmłodszego dobrze rozwiniętego liścia (najczęściej był to trzeci lub czwarty liść licząc od środka rozety) wycinano trzy krążki korkoborem o średnicy 7 mm i zalewano je 1,5 ml N,N-dwumetyloformamidu. Po 24 godzinach ekstrakcji mierzono absorpcję dla długości fal 646,8 nm, 663,8 nm oraz 750 nm. Zawartość chlorofilu obliczano według wzoru:

$$\text{chlorofil a + b [mg/dm}^2\text{]} = 17,67 \times (A_{646,8} - A_{750}) + 7,12 \times (A_{663,8} - A_{750})$$

W doświadczeniu polowym liście do pomiaru pobierano późną jesienią (od 20 listopada do 10 grudnia). W tym samym czasie pobierano liście i mierzono chlorofil w roślinach kontrolnych (po 50 roślin CMS i odmiany Bolko). Jednocześnie opisywano ich kolor i porównywano z kontrolą. W doświadczeniu w fitotronie rośliny rosły w temperaturze 16°C i fotoperiodzie dnia i nocy 16/8 godzin przez 3 tygodnie. Następnie obniżano temperaturę do 10°C pozostawiając bez zmian intensywność oświetlenia i długość fotoperiodu. Po dalszych

2 tygodniach wzrostu temperaturę obniżano do 4°C, redukowano oświetlenie do $\frac{3}{4}$ oświetlenia pełnego i zmieniano fotoperiod dnia i nocy na 14/10 godzin. Opis koloru liści oraz pobranie próbek do ekstrakcji i pomiaru chlorofilu wykonano po 4 tygodniach traktowania roślin niską temperaturą.

Wybrane rośliny jarowizowano w komorze-chłodni w temperaturze 4°C. Po ośmiu lub więcej tygodniach jarowizacji rośliny wysadzano w pole lub do fitotronu i doprowadzano do kwitnienia. U roślin kwitnących opisywano typ kwiatów, liczbę miodników i szacowano ilość wydzielanego nektaru.

Wyniki

Warunki testowania roślin w fitotronie lub okres pobierania liści w doświadczeniu polowym na zawartość chlorofilu były tak dobrane, aby jak najlepiej różnicowały rośliny kontrolne CMS i Bolko. Wszystkie dane zbierane były wtedy, kiedy można było wizualnie łatwo odróżnić jasnozielone–żółte rośliny CMS od zielonych–ciemnozielonych roślin Bolko. Mierzone zawartości chlorofilu również wyraźnie różnicowały obydwie grupy roślin kontrolnych. We wszystkich doświadczeniach zakresy zawartości chlorofilu w obydwu grupach kontrolnych zawsze się wykluczały. Oznaczało to, że maksymalna zawartość chlorofilu u roślin CMS była zawsze niższa od minimalnej zawartości chlorofilu u odmiany Bolko. Z obserwacji tej wynikało główne kryterium selekcji: selekcjonowano rośliny, u których ilość chlorofilu przekraczała największą mierzoną zawartość chlorofilu u roślin CMS w danym doświadczeniu. W tabelach wielkość tę przedstawiono jako procent maksymalnej zawartości chlorofilu u roślin CMS. We wszystkich przypadkach zawartość chlorofilu u wybranych roślin była znacznie (czasami kilkakrotnie) wyższa od średniej zawartości chlorofilu u roślin CMS.

W tabeli 1 zebrano dane określające pochodzenie i częstość występowania wyselekcjonowanych roślin. Dane przedstawione dla doświadczenia polowego obejmują tylko te przypadki, gdzie przeżyła przynajmniej jedna roślina. Test w fitotronie dla pokolenia R₂ był kontynuacją testu polowego, w którym większość roślin wymarzała (mroźna zima 95/96). W związku z tym wybór roślin ograniczono tylko do potomstwa tych roślin R₁, które wysiano i były opisane w doświadczeniu polowym. W fitotronie testowano 383 rośliny pochodzące z 32 roślin R₁ zregenerowanych z czterech niezależnych eksperymentów fuzji. Dalsza część testu w fitotronie przeprowadzona była na potomstwie roślin wybranych wcześniej (pokolenie R₃). Ostatnia część tabeli 1 zawiera opisy roślin R₂ i R₃ wybranych w obydwu wcześniejszych testach i przeznaczonych do dalszej analizy.

Tabela 1

Pochodzenie, liczby analizowanych roślin oraz liczba selekcionowanych roślin pokolenia R₂ i R₃ ze względu na podniesiony w porównaniu z kontrolą CMS poziom chlorofilu — *Origin, number of analysed and selected plants R₂ and R₃ with enhanced (compared with CMS) chlorophyll content*

Rośliny <i>Plants</i> R ₁	Doświadczenie polowe <i>Field experiment</i>				Doświadczenie w fitotronie <i>Growth chamber experiment</i>				Wybrane rośliny <i>Selected plants</i>	
	liczba roślin pokolenia R ₂ <i>number of R₂ plants</i>				liczba roślin R ₂ <i>number of R₂ plants</i>		liczba roślin R ₃ <i>number of R₃ plants</i>			
	wysadzo- nych <i>planted</i>	po zimie <i>after winter</i> **	wybra- nych <i>selected</i>	nr rośliny <i>plant</i> <i>number</i>	testowa- nych <i>tested</i>	wybranych <i>selected</i>	testowa- nych <i>tested</i>	wybranych <i>selected</i>	pokolenie <i>generation</i>	nr rośliny <i>plant</i> <i>number</i>
F1/2	160	10	2	8 PI			30	1	R₃	7 FIII
F1/3	120	1	1				37	–		
F1/4	280	7	2	18 PI			55	1	R₃	232 FII
F1/5	180	10	2	19 PI 29 PI			37	1	R₃	267 FII
F9/1	130	8	1				82	–	R₃	434 FIII
F9/2					8	1			R ₂	
F9/3	120	14	1		12	–				
F9/5	80	31	6		9	–	52	–		
F9/6	80	13	2	63 PI 68 PI	2	–	18	–		
F9/7	80	9	1				22	–	R₃	197, 198, 203, 204, 205
F9/8	80	3	1		56	3	53	6	R ₂	FII, 141 FIII
F9/9	4	1	1	82 PI	14	–	52	–		441 FI, 443 FII, 105
F9/12					14	–	26	–		
					8	–	53	1	R₃	422 FII
					8	–				

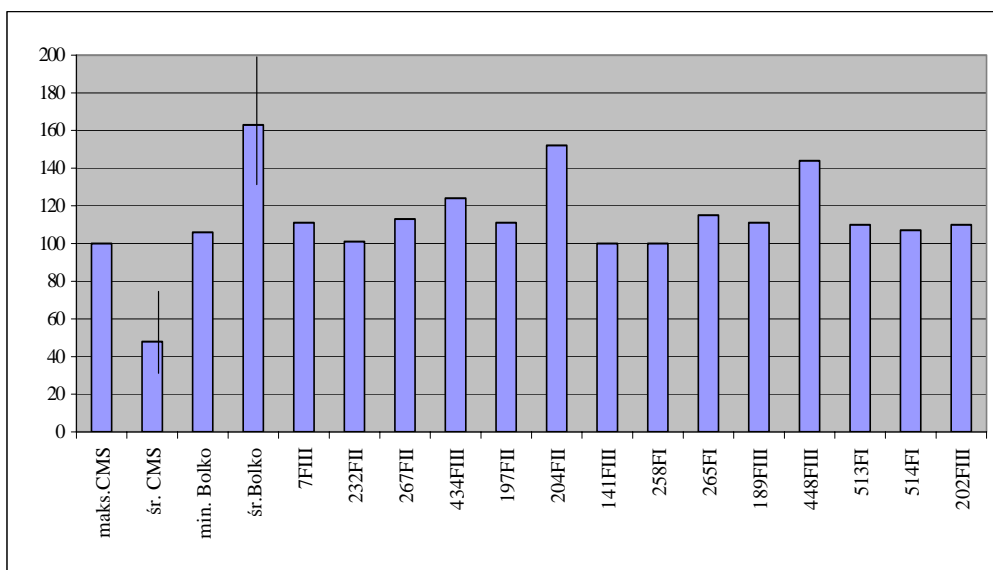
F9/15					37	—				
F9/16					1	—				
F12/2					8	—				
F12/3					47	2			R ₂	
F12/4					10	—				
F12/5					10	1			R ₂	
F12/6					10	—				
F12/7					8	—				
F12/8					8	—				
F12/9					11	—				
F12/12					8	—				
F12/13					8	—				
F12/14					9	—				
F12/16					10	—				
F12/17					10	—				
F12/18					8	—				
F12/19					7	—				
F12/20					6	—				
F12/21					7	—				
F12/23					10	—				
F12/24					12	1			R ₂	211 FIII
F12/26	80	2	2	86 PI			57	4	R₃	258 FI, 265 FI, 189 FIII, 448 FIII
				87 PI			67	1	R₃	274 FI
F23/2	70	2	1	88 PI			46	4	R₃	46, 77, 513 FI, 514 FI
F23/3	80	2	1	90 PI			22	1	R₃	202 FIII
2.6/2					9	—	9	—		
2.6/2F					6	1			R ₂	316 FIII

* — Wytuszczone te przypadki, gdzie poszukiwane rekombinanty występowały w trzech kolejnych pokoleniach

Bold numbers indicate enhanced chlorophyll content in three subsequent generations

** — mroźna zima 95/96 — *severe winter 95/96*

W doświadczeniu polowym wysiano 5000 nasion. Pochodziły one z 70 roślin zregenerowanych po 9 eksperymentach fuzji. Przezimowało 113 roślin będących potomstwem 14 roślin R_1 . Z potomstwa czterech roślin R_1 z fuzji F1 wybrano siedem roślin. W tabeli 1 przedstawiono numery tylko czterech z nich, ponieważ tylko w potomstwie tych roślin w toku dalszej analizy znaleziono odpowiednie rekombinanty. Uwagę zwracają rośliny F1/4 i F1/5. Wywodzące się z nich potomstwo trzech roślin (18 PI, 19 PI i 29 PI) wybranych w doświadczeniu polowym testowano w fitotronie. Z 55, 37 i 82 roślin potomnych wybrano po jednej roślinie 232 FII, 267 FII i 434 FIII. Rośliny te zawierały więcej chlorofilu niż wynosiła maksymalna zawartość dla roślin CMS (rys. 1). Dodatkowo dwie pierwsze w ocenie wizualnej po 6 miesiącach chłodzenia były wyraźnie ciemniejsze od roślin CMS. Kwiaty rośliny 232 FII posiadały dwa małe miodniki, ale nie zauważono wydzielania nektaru.



Rys. 1. Względna zawartość chlorofilu (wyrażona w %) u wyselekcjonowanych roślin w porównaniu z maksymalną zawartością chlorofilu w kontroli CMS przyjętej jako 100%. Dla średnich wartości CMS i Bolko podano odchylenie standardowe (pionowe linie) — *Relative chlorophyll content in selected and control plants compared with the highest chlorophyll content in CMS assumed as 100%. Vertical bars represent standard deviation of average chlorophyll content in CMS (śr.CMS) and Bolko (śr. Bolko)*

Z fuzji F9 testowano potomstwo 11 roślin. Wybrano 13 roślin w doświadczeniu polowym i 4 w fitotronie. W dwóch przypadkach: F9/6 i F9/9 znaleziono odpowiednie rekombinanty zarówno w pokoleniu R_2 jak i R_3 . Wśród 53 roślin potomnych pochodzących od 68PI wyodrębniono 6 roślin o znacznie podwyż-

szonym poziomie chlorofilu, z których jedna, 204FII (rys. 1) osiągnęła zawartość zbliżoną do średniej odmiany Bolko. Rośliny utrzymywane przez 6 miesięcy w chłodni do jarowizacji były wyraźnie ciemniejsze od trzymanyh w tych samych warunkach roślin CMS. Wszystkie rośliny, z wyjątkiem 198FII miały kwiaty z dwoma miodnikami i wydzielały nektar. Dodatkowo testowano 56 roślin R₂ pochodzących z F9/6, z czego wybrano 3 rośliny. Z potomstwa rośliny 82PI wyselekcjonowano roślinę nr 422FII o zwiększonej zawartości chlorofilu i wyraźnie ciemniejszej od roślin CMS po 6 miesiącach chłodzenia.

Z fuzji F12 testowano nasiona dwudziestu roślin R₁, z czego nasiona 19 z nich testowano tylko w fitotronie. W dwóch przypadkach (F12/3 i F12/5) wybrano 3 rośliny z zawartością chlorofilu nieznacznie przekraczającą maksymalną dla CMS. W potomstwie rośliny F12/26 wyodrębniono dwie (86PI i 87PI), których potomstwo również zawierało poszukiwane rekombinaty. W pierwszym przypadku — 86PI z testowanych 57 roślin wybrano cztery o wysokim i bardzo wysokim poziomie chlorofilu. Są to rośliny 258FI, 265FI, 189FIII, 448FIII (rys. 1). Jedna z nich wykazuje zawartość chlorofilu zbliżoną do średniej Bolka. W przypadku drugim — 87PI sprawdzono 67 roślin następnego pokolenia, wśród których znaleziono jedną o poszukiwanej charakterystyce. Obecność roślin znacznie przekraczających maksymalny poziom kontroli czyni z tej grupy obiecujący materiał do dalszej selekcji.

Potomstwo dwóch roślin (F23/2 i F23/3) z kolejnej fuzji również wykazało formy o zwiększonej zawartości chlorofilu. Z 46 roślin pochodzących z 88PI wybrano cztery takie rekombinaty, a z potomstwa rośliny 90PI, gdzie testowano 22 rośliny, wybrano jedną. Wszystkie rośliny pokolenia R₃ miały po dwa miodniki i wydzielały nektar.

Rysunek 1 prezentuje względną zawartość chlorofilu u wybranych roślin w stosunku do maksymalnej zawartości u roślin kontrolnych CMS. Za 100% przyjęto maksymalną zawartość chlorofilu u kontroli CMS w danym doświadczeniu. Druga kolumna przedstawia względną średnią zawartość chlorofilu i odchylenie standardowe u roślin CMS. Dwie następne kolumny to minimalna zawartość chlorofilu u odmiany Bolko oraz średnia zawartość plus odchylenie standardowe u Bolko. Dane dla roślin kontrolnych pochodzą z pomiarów 38–48 roślin w trzech niezależnych doświadczeniach fitotronowych. Przyjmując maksymalną zawartość chlorofilu u roślin CMS za 100%, najniższa zawartość u roślin odmiany Bolko wynosiła 106%, a średnia — 163% z odchyleniem standardowym 36%. Pozostałe kolumny przedstawiają zawartości chlorofilu u niektórych roślin, wybranych w trakcie selekcji (tab. 1). U dwunastu roślin chlorofil przekroczył maksymalną wartość mierzoną u roślin typu CMS. W dwóch przypadkach (rośliny 204FII i 448FIII) zawartość chlorofilu znacznie przekraczała najniższy poziom stwierdzony u roślin CMS i była porównywalna ze średnimi wartościami dla roślin odmiany Bolko.

Wnioski

1. W analizowanych roślinach stwierdzono szeroki zakres zmienności zawartości chlorofilu, przekraczający poziom chlorofilu u roślin kontrolnych CMS.
2. Częstość występowania poszukiwanych rekombinantów wahała się od 0,01 do 0,1. Nie zauważono aby rozkład tych częstości zależał od pochodzenia badanej rośliny lub pokolenia.
3. W potomstwie przynajmniej pięciu roślin zregenerowanych po fuzji protoplastów wystąpiły rekombinanty o kwiatach typu CMS i podwyższonej w stosunku do kontroli CMS zawartości chlorofilu. Rekombinanty te pojawiały się w trzech następujących po sobie pokoleniach.

Literatura

- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej niepłodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. *oleifera*. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, Tom 35, Zeszyt 3, 4.
- Moran M., Porath D. 1980. Chlorophyll determination in intact tissue using N,N-dimethylformamide. *Plant. Physiol.* 65: 478-479.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle, Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 244-250.