

MARIA GOŚKA¹**TERESA KRYSIŃSKA**²**KRYSTYNA STRYCHARCZUK**²¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Bydgoszczy² Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego, Stacja Hodowli Roślin, Straszków

Wykorzystanie gynogenezy *in vitro* dla uzyskania dihaploidów buraka cukrowego

The use of *in vitro* gynogenesis for obtaining sugar beet dihaploids

Metoda kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego może być z powodzeniem stosowana do otrzymania dihaploidów z tetraploidalnych zapylaczy. Wytworzenie dihaploidalnych linii stwarza możliwość uzyskania nowej zmienności z uwagi na wysoką heterozygotyczność tetraploidów. Zalążki tetraploidalnych zapylaczy buraka cukrowego — typu normalnego, cukrowo-normalnego i cukrowego inkubowano na pożywce inicjalnej (MS) zawierającej 1 mg·l⁻¹ BAP i 0,1 mg·l⁻¹ NAA. Genotyp rośliny rodzicielskiej był czynnikiem determinującym zdolność do gynogenezy. Odsetek zalążków tworzących rośliny, w zależności od genotypu, wahał się od 0,2 do 2,0%. Wyższą zdolność do regeneracji roślin obserwowano u typu cukrowo-normalnego, nieco niższą u typu cukrowego i normalnego. Analizy ploidalności otrzymanych regenerantów z niezapłodnionych zalążków wykazały obecność 98,5% roślin diploidalnych i 1,5% tetraploidalnych. Linie dihaploidalne otrzymane z zalążków różnych genotypów były zróżnicowane pod względem cech morfologicznych.

Słowa kluczowe: burak cukrowy, dihaploidy, kultury *in vitro*, niezapłodnione zalążki

The *in vitro* cultures of unpollinated ovules can be successfully used for obtaining dihaploids from tetraploid pollinators. Dihaploid lines from tetraploid pollinators give the feasibility to obtain a new variation from high heterozygous tetraploid materials. Ovules of tetraploid pollinators of sugar beet — N-type, ZN-type and Z-type were used as plant material in the studies. They were incubated on initial medium (MS) with 1 mg·l⁻¹ BAP and 0.1 mg·l⁻¹ NAA. A parental plant genotype affected the ability of gynogenesis. The percentage of plants obtained from ovules varied between 0.2 and 2%. The higher ability of plant regeneration was observed with ZN-type, the lower one was observed with Z-type and N-type. Analysis of ploidy levels of plants obtained from unpollinated ovules showed a 98.5% share of diploids and a 1.5% share of tetraploids. Dihaploid lines obtained from ovules of various genotypes differed in morphological traits.

Key words: dihaploids, *in vitro* culture, sugar beet, unpollinated ovules

WSTĘP

W hodowli odmian heterozyjnych buraka cukrowego wykorzystywane są di- i tetraploidalne wielonasienne zapylacze. Tetraploidalne zapylacze dają z reguły wyższy efekt heterozji na poziomie triploidalnym w porównaniu do mieszańców diploidalnych. Jednak produkcja triploidalnych mieszańców w naszych warunkach klimatycznych jest kłopotliwa, ponieważ nie można uzyskać nasion o wysokiej wartości siewnej. Spowodowane jest to w znacznym stopniu brakiem stabilności cytogenetycznej tetraploidalnych zapylaczy.

Obecnie hodowcy tworzą odmiany diploidalne oparte na liniach wsobnych matecznych. Ze względu na obcopylność buraka uzyskanie linii homozygotycznych przez chów wsobny wymaga 5–6 lat. Dzięki opracowanej metodzie uzyskiwania podwojonych haploidów w kulturach *in vitro* można okres ten skrócić do 2 lat, omijając wieloletni chów wsobny (Goška, 1997). Metoda ta pozwala również na otrzymanie z tetraploidalnych zapylaczy linii dihaploidalnych, stabilnych cytogenetycznie. Wytworzenie linii dihaploidalnych stwarza także możliwość uzyskania nowej zmienności z uwagi na wysoką heterozygotyczność tetraploidów.

Celem pracy było uzyskanie dihaploidów w kulturach *in vitro* z niezapłodnionych zalążków tetraploidalnych wielonasiennych zapylaczy. Po przeprowadzonej selekcji wartościowe linie dihaploidalne mogą być włączone do programu hodowlanego diploidalnych odmian mieszańcowych buraka cukrowego.

MATERIAŁ I METODY

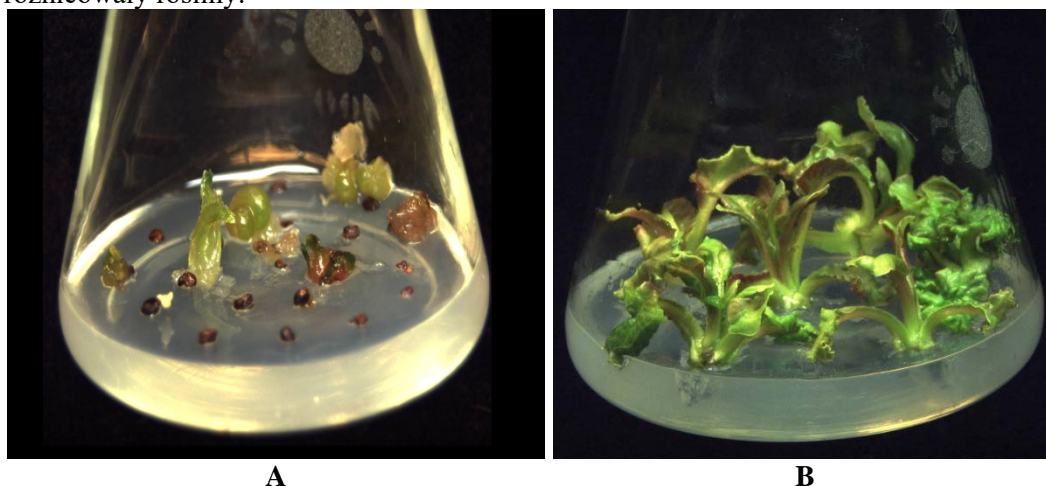
Materiałem wyjściowym do badań były wielonasienne tetraploidalne zapylacze buraka cukrowego — typu normalnego (5 linii), cukrowo – normalnego (4 linie) i cukrowego (5 linii) pochodzące z Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego — Stacji Hodowli Roślin w Straszku. Zalążki do kultur *in vitro* pobierano z roślin rosnących w szklarni i w warunkach polowych. Kwiatostany sterylizowano przez 20 min. w 5% roztworze podchlorynu wapnia i następnie płukano trzykrotnie sterylną wodą. Pod mikroskopem stereoskopowym izolowano zalążki z pięciu zamkniętych pąków znajdujących się na pędzie powyżej kwiatu w stadium antezy. Niezapłodnione zalążki pobierano z pąków kwiatowych przez nacięcie zalążni od strony dna kwiatowego i wykładano na pożywkę inicjalną Murashige i Skooga (MS, 1962) zawierającą $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP i $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA. Inkubację zalążków prowadzono w pokoju hodowlanym w temperaturze 25°C , w 16-godzinnym oświetleniu o natężeniu ok. $40 \text{ mol}^{-3}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ogółem na pożywkę wyłożono 30925 zalążków izolowanych z roślin rosnących w szklarni i 16825 zalążków z roślin rosnących w polu.

Uzyskane z zalążków rośliny przenoszono na pożywkę regeneracyjną w celu ich rozmnożenia. Namnażanie pędów prowadzono na pożywce MS z dodatkiem $0,3 \text{ mg/l}$ BAP i $0,1 \text{ mg/l}$ NAA. Po pierwszym pasażu określono ploidalność regenerantów przy użyciu cytometru przepływowego Partec PA. Prawidłowo rozwinięte pędy (powyżej 2 cm) przenoszono na pożywkę ukorzeniającą, zawierającą $0,01 \text{ mg/l}$ 2iP i $3,0 \text{ mg/l}$ IBA.

Ukorzenione w kulturach *in vitro* rośliny przesadzono do doniczek o średnicy 9 cm, zawierających mieszaninę sterylizowanej ziemi z piaskiem w stosunku 3:1 i umieszczono w kabinach o wysokiej wilgotności.

WYNIKI I DYSKUSJA

W ciągu 14 dni kultury *in vitro* stwierdzono powiększenie zalążków buraka cukrowego oraz zmianę barwy z koloru jasnego na brązowy. Po 3–8 tygodniach niektóre z nich tworzyły rośliny z korzonkiem, hipokotylem i liśćmi. Obserwowano również nietypowe struktury z grubymi i szklistymi liśćmi bez widocznego stożka wzrostu (rys. 1 A). Liściopodobne struktury po dwukrotnym pasażowaniu na pożywkę regeneracyjną różnicowały rośliny.



Rys. 1. Etapy regeneracji dihaploidów z niezapłodnionych zalążków tetraploidalnych zapylaczy buraka cukrowego: A — rośliny otrzymane bezpośrednio z zalążków, B — rośliny po przeniesieniu na pożywkę regeneracyjną

Fig. 1. Stages of dihaploid plants regeneration from unpollinated ovules of tetraploid sugar beet pollinators: A — plants obtained directly from ovules, B — plants after subculture on the regeneration medium

Genotyp rośliny rodzicielskiej był czynnikiem determinującym zdolność do gynogenezy. Odsetek zalążków tworzących rośliny wahał się od 0,2 do 2,0% (tab. 1). Wyższą zdolność do regeneracji roślin obserwowano u typu cukrowo-normalnego, nieco niższą u typu cukrowego i normalnego. Jednakże wśród badanych genotypów typu cukrowego i normalnego wystąpiły również genotypy o wyższej zdolności do regeneracji (odpowiednio 1,4% i 1,0%). Wskazuje to na możliwość uzyskania dihaploidów ze wszystkich typów użytkowych tetraploidalnych zapylaczy buraka cukrowego. Różnice w efektywności gynogenezy między różnymi genotypami obserwowali również Hosemans i Bossoutrot (1985), Doctrinal i wsp. (1989), Lux i wsp. (1990), Potyondi i Heszky (1992) oraz Goška (1997). Hosemans i Bossoutrot (1985) oraz Potyondi i Heszky (1992)

w badaniach nad otrzymaniem roślin haploidalnych wykorzystali linie męskosterylne i płodne. Stwierdzili, że zalążki pobrane z roślin męskosterylnych regenerowały częściej (3,5%) niż z płodnych (2,6%). W doświadczeniach przeprowadzonych przez Lux i wsp. (1990) analizowano około 1300 różnych genotypów płodnych jednonasiennych buraków. Autorzy uzyskali od 0% do 13% haploidów, średnio 1%. Natomiast Goška (1997) przy zastosowaniu odpowiednich warunków zewnętrznych prowadzenia kultury, optymalnej pożywki inicjalnej oraz dobrze reagujących w kulturze *in vitro* genotypów uzyskała do 31,0% regenerujących zalążków.

Tabela 1

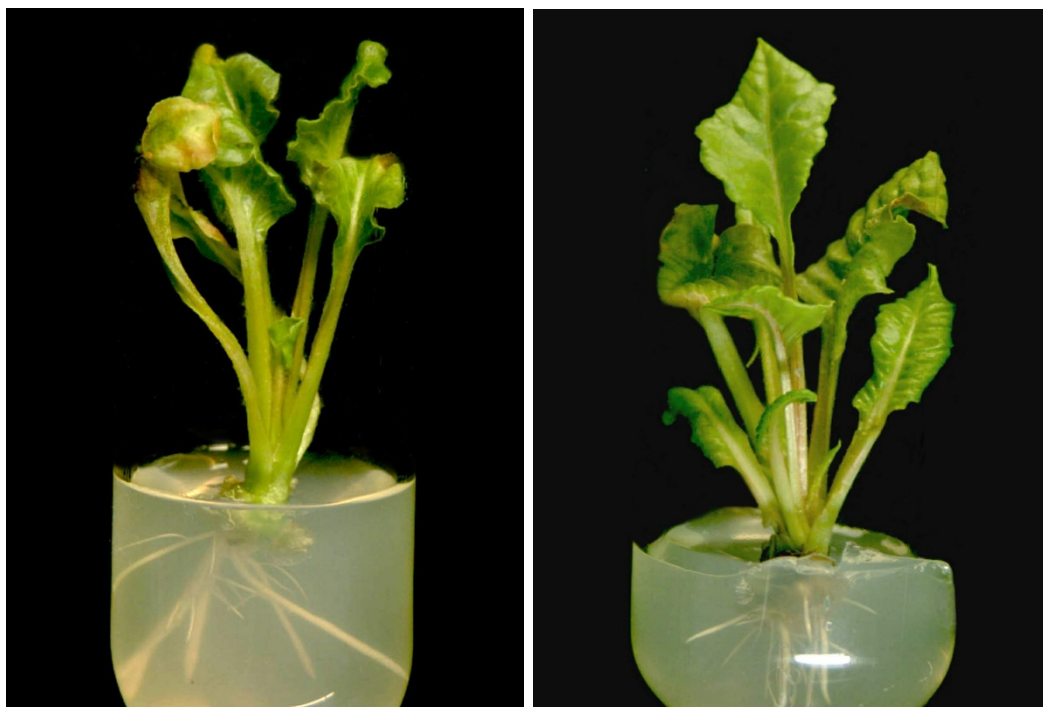
Wpływ genotypu i warunków uprawy buraków cukrowych na efektywność gynogenезы
The influence of genotype and sugar beet cultivation on efficiency of gynogenesis

Genotyp Genotype	Szkłarnia Greenhouse			Pole Field		
	liczba wyłożonych zalążków no. of ovules	liczba roślin no. of plants	% zalążków tworzących rośliny ovules producing plants (%)	liczba wyłożonych zalążków no. of ovules	liczba roślin no. of plants	% zalążków tworzących rośliny ovules producing plants (%)
Typ cukrowy — Z-type						
T 96 148	3550	22	0,6	1400	12	0,9
T 97 094	3150	30	1,0	650	0	0
T 97 264	1950	8	0,4	925	1	0,1
T 98 060	2200	6	0,3	375	0	0
T 98 074	1325	7	0,5	775	0	0
Razem Total	12175	73	0,6	4125	13	0,3
Typ cukrowo-normalny — ZN-type						
T 96 1428	2100	11	0,5	1275	5	0,4
T 97 1186	1500	29	1,9	1875	22	1,2
T 97 1228	2675	31	1,2	1075	7	0,7
T 98 1351	2200	13	0,6	1575	31	2,0
Razem Total	8475	84	1,0	5800	65	1,1
Typ normalny — N-type						
T 95 2066	2000	7	0,4	1350	4	0,3
T 95 2079	2225	32	1,4	1250	14	1,1
T 95 2041	1275	12	1,0	1550	8	0,5
T 99 2007	2850	6	0,2	1300	5	0,4
T 99 2043	1925	7	0,4	1450	3	0,2
Razem Total	10275	64	0,6	6900	34	0,5

Z zalążka tworzyła się tylko jedna roślina, dlatego konieczne było rozmnożenie dihaploidów dla otrzymania większej ilości materiału. Do rozmnożeń wybierano tylko te linie dihaploidalne, które charakteryzowały się wysokim współczynnikiem rozmnażania. Dihaploidy otrzymane z niezapłodnionych zalążków buraka typu cukrowo-normalnego wykazywały wyższy współczynnik rozmnażania w porównaniu z dihaploidami typu cukrowego i normalnego. Rozmnażanie w warunkach *in vitro* prowadzono do piątego pasażu (rys. 1 B). Po pierwszym pasażu oznaczano stopień ploidalności roślin uzyskanych z zalążków różnych genotypów buraka cukrowego. Wśród analizowanych 330 roślin 325

było diploidami (98,5%) a 5 tetraploidami (1,5%). Dihaploidy buraka były stabilne w kulturach *in vitro*. W kolejnych rozmnożeniach wykazywały stały diploidalny poziom ploidalności.

Podczas rozmnażania na pożywce regeneracyjnej dihaploidy nie tworzyły korzeni, dlatego prawidłowo rozwinięte pędy przenoszono na pożywkę ukorzeniającą. Około 90% roślin regenerowało korzenie (rys. 2). Ukorzone w kulturach *in vitro* regeneranty wysadzono do doniczek w szklarni. Nie wszystkie rośliny przeżyły przenoszenie do ziemi. Przyjmowało się około 95% dihaploidów, zależnie od genotypu. Ogółem uzyskano 142 linie dihaploidalne buraka cukrowego, a w każdej linii po 65 roślin.



Rys. 2. Dihaploidalne rośliny buraka cukrowego na pożywce ukorzeniającej
Fig. 2. Dihaploid plants of sugar beet on the rooting medium

Wiosną wysadzono w polu 43 linie dihaploidalne typu cukrowego (ok. 2790 roślin), 61 linii typu cukrowo-normalnego (ok. 3960 roślin) i 38 linii typu normalnego (ok. 2470 roślin). Linie dihaploidalne otrzymane z różnych zalążków i różnych genotypów były zróżnicowane pod względem cech morfologicznych przy jednoczesnej jednorodności w obrębie linii. Rośliny różniły się intensywnością barwy (od jasno do ciemnozielonej) i kształtem liści, długością ogonków i szerokością blaszek liściowych oraz brzegiem blaszki liściowej (od całego do podwójnie karbowanego), (rys. 3). Dihaploidy charakteryzowały się bujnym ulistnieniem i wykształciły korzeń spichrzowy. Korzenie 142 linii dihaploidalnych buraka wykopano i umieszczono w przechowalni.



Rys. 3. Różnice morfologiczne wśród dihaploidów uzyskanych z różnych genotypów buraka cukrowego
Fig. 3. Morphological differences between dihaploid plants obtained from various genotypes of sugar beet

Na wiosnę korzenie wysadzono w izolowanych szkółkach chowu siostrzanego dla oceny cech morfologicznych i biologicznych nasienników.

W niniejszej pracy przeprowadzono obserwacje dihaploidów w pierwszym roku wegetacji. Linie dihaploidalne podobnie jak podwojone haploidy (DH), (Gośka, 1997) wykazywały duże zróżnicowanie cech morfologicznych. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących uzyskania i oceny dihaploidów buraka cukrowego. Prace obejmują zagadnienia związane z otrzymaniem haploidów i podwojonych haploidów (Bossoutrot i Hosemans, 1985; Gośka, 1985; D'Halluin i Keimer, 1986; Pedersen i Keimer, 1996; Wremerth Weich i Levall, 2003) oraz oceny linii DH w warunkach polowych (Steen i in., 1988; Gram, 1989; Gośka, 1997; Svirshchetskaya i Doležel, 2000). Steen i wsp. (1988) obserwowali duże zróżnicowanie cech morfologicznych wśród linii homozygotycznych uzyskanych z haploidów. Oprócz form nieprzydatnych do dalszej hodowli znajdowali linie o prawidłowym wzroście i wysokim plonie korzeni i cukru. Podobnie Svirshchetskaya i Doležel (2000) uzyskali linie podwojonych haploidów o korzystnych cechach użytkowych, które mogą być wykorzystane w hodowli odmian mieszańcowych buraka cukrowego. Z kolei Gram (1989) stwierdził, że wyselekcjonowane linie DH z jednonasiennych diploidów oraz ich mieszańce plonowały poniżej odmiany wzorcowej (95%–99%). Gośka (1997) również obserwowała znaczne zróżnicowanie cech morfologicznych linii DH uzyskanych z jedno- i wielonasiennych diploidalnych buraków cukrowych. Podwojone haploidy w wyniku samozapylenia słabo zawiązywały nasiona (20,1%) co w znacznym stopniu ograniczało otrzymanie kolejnych generacji.

Homozygotyczne linie uzyskane z haploidów okazały się mało przydatne w hodowli buraka (Gośka, 1997) i dlatego w niniejszej pracy przedstawiono metodę uzyskiwania dihaploidów z tetraploidalnych wielonasiennych zapylaczy. Otrzymane 142 linie dihaploidalne, po ocenie cech użytkowych oraz wartości kombinacyjnej, mogą być wykorzystane jako materiały wyjściowe do tworzenia formy ojcowskiej mieszańcowych odmian buraka cukrowego.

LITERATURA

- Bossoutrot D., Hosemans D. 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: From *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Reports* 4: 300 — 303.
- D'Halluin K., Keimer B. 1986. Production of haploid sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. In: *Genetic manipulation in plant breeding*. W. de Gruyter, Berlin, New York: 307 — 309.
- Doctrinal M., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S. 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 17: 1 — 12.
- Gośka M. 1985. Sugar beet haploids obtained in the *in vitro* culture. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.* 33: 31 — 33.
- Gośka M. 1997. Haploidy i podwojone haploidy buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz możliwości ich wykorzystania w hodowli. *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, Radzików*: 1 — 81.
- Gram N. H. 1989. The use of doubled haploids in the beet breeding program. XXV General Meeting ASSBT. *J. Sugarbeet Res.* 26: A8.
- Hosemans D., Bossoutrot D. 1985. *In vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.) ovules of male sterile and male fertile plants and induction of haploid plants. In: *Experimental Manipulation of Ovule Tissues*. Plant Science. G. P. Chapman, S. H. Mantell, R. W. Daniels. Longman, New York: 79 — 88.

- Lux H., Herrmann L., Wetzel C. 1990. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breeding* 104: 177 — 183.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 — 497.
- Pedersen H. C., Keimer B. 1996. Haploids in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Acad. Publ.: 17 — 36.
- Potyondi L., Heszky L. 1992. Gynogenic haploids produced in ovule cultures of male sterile, fertile, mono- and multigerm sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. *Acta Agronomica Hungarica* 41: 125 — 130.
- Steen P., Keimer B., Smed E. 1988. Homozygote lines in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *International Symposium — Eucarpia. Genetic Manipulation in Plant Breeding*, 73.
- Svirshchevskaya A., Doležel J. 2000. Production and performance of gynogenetic sugarbeet lines. *J. Sugar Beet Research* 37: 117 — 133.
- Wremerth Weich E., Levall M. W. 2003. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Kluwer Acad. Publ. 255 — 263.