

**DOROTA ŁASKOWSKA****APOLONIUSZ BERBEĆ**

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

## Nowa męskosterylna linia *Nicotiana tabacum* L. z cytoplazmą *N. wuttkei* Clarkson et Symon

### The new alloplasmic *Nicotiana tabacum* L. line with *Nicotiana wuttkei* Clarkson et Symon cytoplasm

Męska sterylność, spowodowana interakcją między genomami: jądrowym i cytoplazmatycznym, pochodzącymi od dwóch różnych gatunków, jest wykorzystywana w hodowli mieszańców F<sub>1</sub> tytoniu. Nową linię męskosterylną tytoniu szlachetnego otrzymano w wyniku wprowadzenia jądra *N. tabacum* odmiany Wiślica (2n = 48) do cytoplazmy dzikiego gatunku *Nicotiana wuttkei* Clarkson et Symon (2n = 32), odkrytego w 1984 roku w Australii. Mieszańcem wyjściowym był otrzymany wcześniej amphidiploid *N. wuttkei* × *N. tabacum* (2n=80). W pierwszym etapie otrzymano formę seskwidiploidalną (2n=64), wytwarzającą pyłek o płodności od 0% do 40%, którą w ciągu sześciu kolejnych pokoleń krzyżowano wstecznie z *N. tabacum*. Rośliny uzyskanej w ten sposób linii alloplazmatycznej *N. tabacum* odmiany Wiślica z cytoplazmą *N. wuttkei* były całkowicie męskosterylne, lecz zachowały pełną płodność żeńską. Stwierdzono modyfikacje morfologiczne organów kwiatowych takie jak: postrzępiona korona kwiatowa, wystający słupek oraz brak pręcików. Porównano cechy wzrostu i rozwoju formy męskosterylnej z cytoplazmą *N. wuttkei* i komercyjnie wykorzystywanych linii alloplazmatycznych tytoniu. Stwierdzono silniejszy ujemny wpływ cytoplazmy *N. wuttkei* niż cytoplazm: *N. tabacum*-mutant, *N. bigelovii* i *N. suaveolens* na wysokość roślin, liczbę i wielkość liści oraz długość okresu do kwitnienia u odpowiednich linii męskosterylnych wprowadzonych z odmiany Wiślica.

**Słowa kluczowe:** cytoplazmatyczna męska sterylność, krzyżowanie międzygatunkowe, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana wuttkei*, tytoń szlachetny

Cytoplasmic-nuclear male sterility (cms) is an important biological tool, which has been used by plant breeders to produce commercial hybrid cultivars. A new source of cytoplasmic male sterility in tobacco with interspecific origin is reported. The new wild species *Nicotiana wuttkei* Clarkson et Symon (2n = 32), which was discovered in Australia in 1984, is used as the donor of cytoplasm. The nuclear donor is *N. tabacum* L. cv. Wiślica (2n = 48). Alloplasmic *N. tabacum* cv. Wiślica cms *wuttkei* was developed in a backcrossing program from the amphidiploid *N. wuttkei* × *N. tabacum* (2n = 80), developed in a previous study. In the first step, sesquidiploid plants (2n = 64) were produced, at 0% to 40% pollen germination. Sesquidiploid plants were back-crossed with the *N. tabacum* cv. Wiślica for six successive generations and an alloplasmic line were obtained. The plants of the alloplasmic line were male sterile, while their female fertility was normal. The phenotypic effect of *N. wuttkei* cytoplasm included ragged corolla, protruding stigma, absence of stamens and modified plant habit. Some growth and development traits of *N. tabacum* cv. Wiślica cms *wuttkei* were compared with those of

commercially exploited tobacco alloplasmic lines. Plants of cms *wuttkei* were shorter, had fewer and smaller leaves and flowered later than those of cms *tabacum*-mutant, cms *bigelovii* or cms *suaveolens*.

**Key words:** cytoplasmic male sterility, interspecific hybridization, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana wuttkei*, tobacco

#### WSTĘP

W Zakładzie Hodowli i Uprawy Roślin Specjalnych IUNG-PIB w Puławach znajduje się kolekcja 16 linii alloplazmatycznych tytoniu utworzonych z wykorzystaniem genomu jadrowego odmiany Wiślica. Linie z cytoplazmą gatunków: *N. amplexicaulis*, *N. raimondii*, *N. knightiana*, *N. exigua*, *N. eastii*, *N. glauca*, *N. tabacum*-mutant otrzymano w wyniku prac hodowlanych prowadzonych w IUNG (Berbec, 1966; Berbec, 1974; Berbec i Berbec, 1992; Berbec i Doroszevska, 1992). Cytoplazmatyczna męska sterylność jest wykorzystywana w hodowli i nasiennictwie tytoniu. W zależności od rodzaju obcej cytoplazmy i jej wpływu na wzrost i rozwój roślin, poszczególne linie alloplazmatyczne mają różną wartość użytkową.

Celem pracy było wyhodowanie nowej linii męskosterylnej tytoniu odmiany Wiślica z cytoplazmą *N. wuttkei*, gatunku odkrytego w 1984 roku w Australii (Clarkson i Symon, 1991).

#### MATERIAŁ I METODY

Materiałem wyjściowym były: otrzymany wcześniej mieszańiec amfidiploidalny *N. wuttkei* × *N. tabacum* odmiana Wiślica, zawierający po dwa haploidalne genomy każdego z tych gatunków (WWTT,  $2n = 80$ ) (Laskowska, 2004) oraz odmiana *N. tabacum* — Wiślica (TT,  $2n = 48$ ). Mieszańca powstałego w wyniku krzyżowania form wyjściowych, posiadającego dwa haploidalne genomy *N. tabacum* i jeden haploidalny genom *N. wuttkei* nazywano seskwidiploidem (WTT,  $2n = 64$ ).

Krzyżowanie prowadzono w warunkach szklarniowych. Przed zapyleniem kwiaty kastrowano, a następnie na znamiona słupków nanoszono pyłek uzyskany z wcześniej zebranych pylników. Określano liczbę chromosomów w komórkach młodych płatków korony metodą Burns (1964) oraz obliczano liczbę biwalentów w metafazie I mejozy w komórkach macierzystych pyłku (KMP) (Burns, 1982). Płodność pyłku obliczano jako procent dojrzałych ziaren barwiących się acetokarminem. Liczono zapyłone kwiaty, zebrane torebki nasienne, nasiona uzyskane z jednej torebki nasiennej oraz określano zdolność kiełkowania nasion i żywotność siewek (jako procent roślin, które nie zamierały w stadium liścieni).

Linie męskosterylną *N. tabacum* cms *wuttkei* pokolenia BC<sub>6</sub> porównano w warunkach polowych z liniami cms *suaveolens*, cms *tabacum*-mutant i cms *bigelovii* oraz płodną odmianą *N. tabacum* — Wiślicą pod względem wysokości roślin, liczby liści, powierzchni liścia środkowego oraz początku kwitnienia roślin. Rośliny rosły w rozstawie 90 × 40 cm, na poletkach o powierzchni 18,8 m<sup>2</sup>, w dwóch powtórzeniach. Zastosowano standardową agrotechnikę opracowaną dla tytoniu typu Virginia. Do pomiarów i obserwacji wybierano

losowo po 10 roślin z każdego poletka. Powierzchnię liścia środkowego podawano według wzoru: długość liścia  $\times$  szerokość liścia  $\times$  0,6345 (Suggs i in., 1960).

Wyniki obserwacji i pomiarów opracowano statystycznie, przeprowadzając analizę wariancji przy poziomie ufności  $\alpha = 0,05$ . Grupy jednorodnie wyznaczono w oparciu o test Duncana.

## WYNIKI

Rośliny amfidiploidalne skrzyżowano z odmianą *N. tabacum* — Wiślicą i otrzymano 29 roślin seskwidiploidalnych, z których większość miała 64 chromosomy w komórkach somatycznych, jedynie u 4 roślin stwierdzono obecność 62 chromosomów. Płodność pyłku roślin seskwidiploidalnych wynosiła od 0 do blisko 40% (tab. 1).

Tabela 1

**Cytologia seskwidiploida *N. wuttkei*  $\times$  *N. tabacum* oraz krzyżowań wstecznych**  
**Cytology of *N. wuttkei*  $\times$  *N. tabacum* sesquidiploid and postsesquidiploid generations**

Pokolenie Generation	Liczba badanych roślin No. of plants examined	Liczba badanych KMP No. of PMCs examined	Liczba chromosomów w komórkach somatycznych No. of somatic chromosomes	Średnia liczba bivalentów na komórkę Mean bivalent number	Płodność pyłku (%) Pollen viability (%)
Seskwidiploid Sesquidiploid	29	104	62–64	23,8	0,0–38,6
BC <sub>1</sub>	20	—	48–54	—	brak pyłku lack of pollen
BC <sub>2</sub>	20	—	48–50	—	brak pyłku lack of pollen

Rośliny seskwidiploidalne były samo-sterylne, lecz część z nich była zdolna do wiązania nasion po zapyłaniu Wiślicą. Ich cechą charakterystyczną była niska zdolność kiełkowania nasion i słaba żywotność siewek, a także bardzo mała średnia liczba nasion w jednej torebce nasiennej, która jednak wzrastała w pokoleniach z krzyżowań wstecznych (tab. 2).

Tabela 2

**Żywotność i płodność seskwidiploida *N. wuttkei*  $\times$  *N. tabacum* oraz krzyżowań wstecznych**  
**Viability and fertility of *N. wuttkei*  $\times$  *N. tabacum* sesquidiploid and postsesquidiploid generations**

Pokolenie Generation	Zdolność kiełkowania nasion (%) Seed germination capacity (%)	Żywotność siewek (%) Seedlings viability (%)	Zbrane torebki nasienne (%) Seed capsules collected (%)	Średnia liczba nasion w 1 torebce nasiennej Mean no. of seeds per capsule
Seskwidiploid Sesquidiploid	29,7	10,2	32,8	15,7
BC <sub>1</sub>	42,3	12,8	36,8	58,9
BC <sub>2</sub>	51,3	41,1	62,4	119,6
BC <sub>6</sub>	98,0	100,0	90,0	2500,0



Rys. 1. Budowa kwiatu *N. tabacum* cv. Wiślica (a) i kwiatów roślin pokolenia BC<sub>1</sub> (b-g)  
Fig. 1. Flower structure of *N. tabacum* cv. Wiślica (a) and the flowers of BC<sub>1</sub> generation plants (b-g)



Rys. 2. Budowa kwiatu linii *N. tabacum* cv. *Wiślica cms wuttkei* BC<sub>6</sub> (u góry) w porównaniu z budową kwiatu płodnej odmiany *Wiślica* (u dołu)  
Fig. 2. Flower structure of *N. tabacum* cv. *Wiślica cms wuttkei* BC<sub>6</sub> line (at the top) in comparison with fertile cultivar *Wiślica* (at the bottom)

Zapylenie formy seskwidiploidalnej pyłkiem odmiany Wiślica pozwoliło otrzymać rośliny pokolenia BC<sub>1</sub>, zawierające w komórkach somatycznych od 48 do 54 chromosomów (tab. 1). Rośliny pokolenia BC<sub>1</sub> były bardzo zróżnicowane pod względem morfologicznym. Charakterystyczne były modyfikacje w budowie kwiatu, w tym różne rodzaje degradacji pręcików, prowadzące do męskiej niepłodności (rys. 1). W wyniku dalszych pięciu krzyżowań wstecznych z *N. tabacum* i rygorystycznej selekcji według typu rodzica wypierającego otrzymano ustaloną linię alloplazmatyczną z cytoplazmą *N. wuttkei* i pełnym genomem jądrowym *N. tabacum* odmiany Wiślica, charakteryzującą się całkowitym brakiem pylników oraz postrzępioną, lekko skróconą koroną kwiatową (rys. 2).

Linia *N. tabacum* cms *wuttkei* w porównaniu do odmiany wyjściowej Wiślica oraz komercyjnie wykorzystywanych linii męskosterylnych z cytoplazmą *N. tabacum*-mutant, *N. bigelovii* i *N. suaveolens* charakteryzowała się niższym wzrostem, mniejszą liczbą liści o mniejszej powierzchni oraz późniejszym zakwitaniem (tab. 3). Różnice te nie były istotne jedynie w porównaniu do linii cms *suaveolens* dla powierzchni liścia środkowego oraz w porównaniu do linii cms *tabacum*-mutant i cms *suaveolens* dla liczby dni do kwitnienia.

Tabela 3

**Niektóre cechy wzrostu i rozwoju odmiany *N. tabacum* cv. Wiślica i jej izogenicznych analogów z cytoplazmą *N. wuttkei*, *N. tabacum*-mutant, *N. bigelovii* i *N. suaveolens*. Między wartościami oznaczonymi tymi samymi literami brak istotnych różnic**  
**Some growth and development features of *N. tabacum* cv. Wiślica cultivar and its iso-genomic counterparts with *N. wuttkei*, *N. tabacum*-mutant, *N. bigelovii* and *N. suaveolens* cytoplasm. Values that share the same superscript are not significantly different**

Genotyp Genotype	Wysokość roślin (cm) Plant high (cm)	Liczba liści Leaf number	Powierzchnia liścia środkowego (cm <sup>2</sup> ) Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Liczba dni do kwitnienia Days to flower
mf	199,3 <sup>bc</sup>	24,4 <sup>b</sup>	1180,1 <sup>c</sup>	78 <sup>a</sup>
cms <i>wuttkei</i>	160,3 <sup>a</sup>	19,5 <sup>a</sup>	940,6 <sup>a</sup>	95 <sup>c</sup>
cms <i>tabacum</i> (mut.)	197,0 <sup>b</sup>	22,9 <sup>b</sup>	1172,2 <sup>bc</sup>	91 <sup>c</sup>
cms <i>bigelovii</i>	205,7 <sup>c</sup>	23,6 <sup>b</sup>	1079,5 <sup>bc</sup>	82 <sup>ab</sup>
cms <i>suaveolens</i>	199,1 <sup>bc</sup>	23,9 <sup>b</sup>	1043,1 <sup>ab</sup>	88 <sup>bc</sup>
NIR <sub>(α=0,05)</sub>	7,55	1,75	136,48	8,09
LSD <sub>(α=0,05)</sub>				

## DYSKUSJA

W pierwszym etapie prac hodowlanych, w wyniku zapylenia amfidiploida *N. wuttkei* × *N. tabacum* pyłkiem odmiany uprawnej Wiślica, powstał mieszaniec seskwidiploidalny. Według terminologii podanej przez Goodspeeda (1954) oraz Chaplina i Manna (1961) określenia seskwidiploid używa się dla mieszańców *Nicotiana* zawierających dwa haploidalne genomy *N. tabacum* i jeden gatunku dzikiego. Mieszaniec seskwidiploidalny gatunków *N. wuttkei* i *N. tabacum* odmiany Wiślica zawierał cytoplazmę *N. wuttkei* i prawdopodobnie około 75% materiału genetycznego *N. tabacum*. Zapylenie wsteczne formy seskwidiploidalnej pyłkiem *N. tabacum* odmiany Wiślica prowadziło do powstania roślin pokolenia BC<sub>1</sub>, charakteryzujących się rozszczepieniem cech morfologicznych

i różnym rodzajem deformacji w budowie korony kwiatowej oraz pylników. Zróżnicowanie roślin pokolenia BC<sub>1</sub> było spowodowane różną liczbą chromosomów w komórkach somatycznych poszczególnych roślin, a także zakłóceniami powodowanymi przez połączenie cytoplazmy *N. wuttkei* z czynnikami jądrowymi o przewodzie chromosomów *N. tabacum* odmiany Wiślica.

Dalsze krzyżowanie wsteczne z *N. tabacum* dało w rezultacie linię alloplazmatyczną z cytoplazmą *N. wuttkei* i jądrowymi czynnikami genetycznymi *N. tabacum*, o dość charakterystycznej modyfikacji kwiatów. U form alloplazmatycznych tytoniu największe zmiany w budowie kwiatu dotyczą zwykle pręcików, które mogą być całkowicie zredukowane, przekształcone w twory płatkowate lub słupkowate lub mieć skrócone nitki. Słupek rzadziej podlega modyfikacjom, zmiany polegają najczęściej na skróceniu słupka, czasem występuje staśmienie lub wielokrotne znamiona słupka. Największą modyfikacją korony kwiatowej bywa jej skrócenie, które powoduje, że słupek wystaje ponad koronę (Nikova i Tsikov, 1976; Gerstel, 1980; Berbeć, 2001; Berbeć i Laskowska, 2005). U linii cms *wuttkei* występuje całkowity brak pręcików, podobnie jak w przypadku opisywanych w powyższych pracach linii męskosterylnych z cytoplazmą *N. tabacum*-mutant, *N. glauca*, *N. suaveolens*, *N. bigelovii*, *N. megalosiphon*, *N. undulata*, *N. debneyi*. Słupek jest normalny, podobnie jak u większości alloplazmatyków tytoniu. Dość nietypowa postrzępiona korona kwiatowa, charakterystyczna dla linii cms *wuttkei*, występuje także u kombinacji z cytoplazmą *N. debneyi* (Sand, 1968).

Otrzymana cytoplazmatyczna męska sterylność, uwarunkowana oddziaływaniem cytoplazmy *N. wuttkei*, dziedziczy się w linii matecznej, niezależnie od użytej formy ojcowskiej, a w zaawansowanych pokoleniach z krzyżowań wypierających nie występuje segregacja na rośliny męsko-sterylne i męskopłodne.

Zmniejszenie powierzchni i liczby liści oraz mniejsza wysokość roślin są najczęstszymi efektami wpływu obcej cytoplazmy na wzrost i rozwój linii alloplazmatycznych tytoniu (Chaplin, 1964; Legg i in., 1974; Berbeć i Laskowska, 2004; Berbeć i Laskowska, 2005). Ponieważ rośliny alloplazmatycznego anologa odmiany Wiślica z cytoplazmą *N. wuttkei* były niższe, zakwitały później i miały liście o mniejszych wymiarach w porównaniu do roślin wyjściowej odmiany płodnej, linia ta prawdopodobnie nie będzie miała zastosowania w komercyjnej produkcji mieszańców F<sub>1</sub> tytoniu.

#### WNIOSKI

1. Linie męskosterylne *N. tabacum* odmiany Wiślica z cytoplazmą *N. wuttkei* można uzyskać w wyniku wielokrotnego krzyżowania wstecznego amfidiploidalnej formy *N. wuttkei* × *N. tabacum* cv. Wiślica z *N. tabacum* cv. Wiślica.
2. Cytoplazmatyczna męska sterylność uwarunkowana oddziaływaniem cytoplazmy *N. wuttkei* dziedziczy się w linii matecznej, niezależnie od użytej formy ojcowskiej, a w zaawansowanych pokoleniach z krzyżowań wypierających nie występuje segregacja na rośliny męsko-sterylne i męskopłodne.
3. Porównując linie męskosterylne wyprowadzone z odmiany Wiślica, stwierdzono silniejszy ujemny wpływ cytoplazmy *N. wuttkei* niż cytoplazm: *N. tabacum*-mutant,

*N. bigelovii* i *N. suaveolens* na wysokość roślin, liczbę i wielkość liści oraz długość okresu do kwitnienia.

#### LITERATURA

- Berbec A. 2001. Floral morphology and some other characteristics of iso-genomic alloplasmics of *Nicotiana tabacum* L. Beitr Tabakforsch 19 (6): 309 — 314.
- Berbec A., Doroszevska T. 1992. Alloplazmatyczne formy tytoniu uprawnego (*Nicotiana tabacum* L.) z podstawioną cytoplazmą gatunków *Nicotiana amplexicaulis*, *N.knightiana* i *N.raimondii*. Pam. Puł. 100: 141 — 150.
- Berbec A., Laskowska D. 2004. Agronomic performance of flue-cured tobacco F<sub>1</sub> hybrids obtained with different sources of male sterile cytoplasm. Beitr Tabakforsch 21(4): 234 — 239.
- Berbec A., Laskowska D. 2005. Investigations of isogenomic alloplasmics of flue-cured tobacco *Nicotiana tabacum* cv. Wislica. Beitr Tabakforsch 21(5): 258 — 263.
- Berbec J. 1966. Badania nad krzyżówką *Nicotiana glauca* × *N.tabacum*. Pam. Puł. 21: 195 — 209.
- Berbec J. 1974. A cytoplasmic male sterile mutant form of *Nicotiana tabacum* L. Zeit. Pflzucht. 73: 204 — 216.
- Berbec J., Berbec A. 1992. Męska jałowość u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uzyskana droga jednoetapowego podstawienia cytoplazmy gatunku *Nicotiana eastii* Kostoff. Pam Puł. 100: 136 — 139.
- Burns J. A. 1964. A technique for making preparations of mitotic chromosomes from *Nicotiana* flowers. Tob. Sci. 8: 1 — 2.
- Burns J.A. 1982. The chromosomes of *Nicotiana africana* Merxm.: a recently discovered species. J. Hered. 73: 115 — 118.
- Chaplin J. F. 1964. Use of male sterile tobaccos in the production of hybrid seed. Tob. Sci. 8: 105 — 109.
- Chaplin J. F., Mann T.J. 1961. Interspecific hybridization, gene transfer and chromosome substitution in *Nicotiana*. North Carolina Expt. Stat. Tech. Bull. 145: 1 — 31.
- Clarkson J. R., Symon D. E. 1991. *Nicotiana wuttkei* (Solanaceae), a new species from north-eastern Queensland with an unusual chromosome number. Austrobaileya 3 (3): 389 — 392.
- Gerstel D. U. 1980. Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana* (A review). North Carolina Agric. Res. Service Tech. Bul. 263: 1 — 31.
- Goodspeed T. H. 1954. The genus *Nicotiana*. Chronica Botanica. Waltham, Mass., USA.
- Laskowska D. 2004. Analiza cytologiczna i płodność roślin mieszańcowych *Nicotiana wuttkei* Cl. et S. × *N. tabacum* L. odm. Wiślica. Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Rozprawy i monografie 11: 75 — 80.
- Legg P. D., Collins G. B., Litton C. C. 1974. Cytoplasmic male sterility and the utilization of hybrids in burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Tob. Sci. 18: 167 — 169.
- Nikova V., Tsikov D. 1976. Comparative investigations on flower morphogenesis in various tobacco sources of cytoplasmic male sterility. Genet. Plant Breed. (Sofia) 9: 362 — 374.
- Sand S. A. 1968. Genetic modification of cytoplasmic male sterility in tobacco. J. Hered. 59: 175 — 177.
- Suggs C. W., J. F. Beeman, Splinter W. E. 1960. Physical properties of green Virginia-type tobacco leaves. Part. III. Relation of leaf length and width to leaf area. Tobacco Science 4: 194 — 197.