



Diploidyzacja gynogenicznych roślin cebuli (*Allium cepa* L.)

Ewa Nowak

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza, Kraków

Chromosome doubling of gynogenic onion plants (*Allium cepa* L.)

Summary

The objective of the present work was to develop a simple and reliable protocol for chromosome doubling in haploid onion plants. Research on gynogenic plants obtained from different genotypes of onion was carried out over two years. In the first year, diploidization was examined *in vivo* with 2.5 mM colchicine for 24 h. In the next year, *in vitro* tests using 0.25 mM and 1.25 mM colchicine or 1.00 μ M and 5.00 μ M trifluralin were carried out. Both antimetabolic agents were applied for 72 h at 14°C or 23°C.

The obtained results showed that colchicine applied *in vivo* caused twice as high loss of the plant material than diploidization at *in vitro* conditions. Antimetabolic agents added to culture media decreased the plant capability to regenerate. Colchicine was found to be less toxic than trifluralin. The use of colchicine allowed for producing more diploids than trifluralin.

Key words:

Allium cepa, gynogenesis, diploidization, colchicine, trifluralin.

Adres do korespondencji

Ewa Nowak,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza,
Al. 29-Listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
rlnowak@cyf-kr.edu.pl

1. Wstęp

Gynogeneza to proces polegający na indukcji sporofitycznego rozwoju haploidalnych komórek gametofitu żeńskiego w kulturach *in vitro* nie zapłodnionych zalążków, zalążni lub pąków kwiatowych (1). Technika ta może stanowić alternatywną do chowu wsobnego metodę otrzymywania homozygotycznego materiału dla hodowli mieszańcowej cebuli. Czynnikiem ograniczającym jej zastosowanie na szerszą skalę jest charakterystyczny dla roślin gynogenicznych cebuli, niski procent spontanicznego

podwojenia liczby chromosomów. Większość gynogenicznej populacji (do 90%) to haploidy, które są sterylne (2-5). Niezbędne jest zatem indukowane podwojenie genomu. Celem badań było znalezienie prostej i wydajnej metody diploidyzacji haploidalnych roślin cebuli.

2. Materiał i metody

Prace badawcze prowadzono na gynogenicznych roślinach pochodzących z różnych genotypów cebuli. Ploidalność otrzymanej populacji oceniano za pomocą cytometru przepływowego Partec CA II. W roku 1997 podwajanie liczby chromosomów przeprowadzono w trakcie przenoszenia roślin z warunków *in vitro* do *in vivo* mocząc korzenie haploidów w 2,5 mM roztworze kolchicyny przez 24 godziny. W roku 1998 badano działanie kolchicyny (0,25 mM; 1,25 mM) i trifluralinu (1 μ M; 5 μ M) w warunkach *in vitro*. Ze zregenerowanych z zarodków roślin haploidalnych usuwano liście i korzenie, a pozostałe zgrubienie dzielono na dwie części i wykładano na pożywkę M3 (BDS bez regulatorów wzrostu wg Champion i wsp. (6)) zawierającą kolchicynę lub trifluralin, a następnie umieszczano w temperaturze 14 lub 23°C. Po siedemdziesięciu dwóch godzinach eksplantaty dokładnie płukano w sterylnej wodzie i przenoszono na świeżą pożywkę M3 (bez związków antymitotycznych) dla regeneracji pędów. Efekt działania substancji antymitotycznych oceniano za pomocą cytometrii przepływowej około trzy miesiące po aklimatyzacji zregenerowanych roślin do warunków *in vivo*.

3. Wyniki

Kolchicyna stosowana w warunkach *in vivo* powodowała utratę dwukrotnie większej części materiału roślinnego w porównaniu do diploidyzacji w warunkach *in vitro*. Z sześćdziesięciu pięciu roślin, których korzenie moczone w 2,5 mM roztworze tego alkaloidu, zaledwie osiem (12%) wytworzyło cebule, pozostałe obumarły w trakcie wegetacji. Z czterech cebul pozostałych po przechowaniu wszystkie posiadały diploidalny lub tetraploidalny zestaw chromosomów.

Dodanie związków antymitotycznych do pożywek wpływało na obniżenie zdolności do regeneracji eksplantatów. Spośród czterystu dziewiętnastu roślin poddanych procesowi diploidyzacji *in vitro* 28% podjęło dalszą regenerację (tab. 1). W większości przypadków zarówno kolchicyna jak i trifluralin powodowały szklistość tkanek. Współczynnik regeneracji dla wszystkich kombinacji był stosunkowo niski i wahał się od 11 do 41%. Wyższe stężenie trifluralinu (5,0 μ M) powodowało znaczne obniżenie (do 11%) przeżywalności eksplantatów, podczas gdy 1 μ M tego związku pozwalał na dwukrotnie wyższą regenerację. Lepszą zdolność do regeneracji obserwowano po zastosowaniu kolchicyny: od 18% dla 0,25 mM w 14°C do 41% dla 1,25 mM

w 14°C. Obniżenie temperatury nie zmniejszyło toksycznego wpływu kolchicyny na tkankę merystematyczną piętki cebuli.

Tabela 1

Wpływ związków antymitotycznych, stosowanych *in vitro*, na regenerację gynogenicznych roślin cebuli (K-kolchicyna, T-trifluralin)

Czynnik	Liczba badanych roślin	Rośliny (%)			
		szkliste	niezregenerowane	zregenerowane	zaaklimatyzowane do <i>in vivo</i>
0,25 mM K 14°C	71	45	82	18	38
0,25 mM K 23°C	140	34	66	34	60
1,25 mM K 14°C	44	36	59	41	78
1,25 mM K 23°C	50	34	68	32	81
1,0 µM T 23°C	51	43	71	29	53
5,0 µM T 23°C	63	54	89	11	71
Średnia	419	40	72	28	63

Wśród siedemdziesięciu czterech roślin zaaklimatyzowanych z warunków *in vitro* do *in vivo* 43% miało dwukrotnie zwiększoną liczbę chromosomów, podczas gdy pozostałe 57% było nadal haploidami (tab. 2). Stwierdzono dwukrotnie wyższy średni współczynnik podwojenia po zastosowaniu kolchicyny (48%) w porównaniu do trifluralinu (23%). Dodanie do pożywki 1,25 mM roztworu kolchicyny efektywniej stymulowało duplikację genomu, współczynnik podwojenia w 14°C wynosił 43%, a w 23°C aż 77%. Nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu zastosowanych temperatur na polepszenie diploidyzacji gynogenicznych roślin cebuli w warunkach *in vitro*.

Tabela 2

Efektywność podwojenia genomu haploidalnych roślin cebuli po zastosowaniu kolchicyny (K) i trifluralinu (T) w warunkach *in vitro*

Czynnik	Liczba roślin zaaklimatyzowanych do <i>in vivo</i>	Liczba		Współczynnik podwojenia (%)
		haploidów	diploidów	
0,25 mM K 14°C	5	3	2	40
0,25 mM K 23°C	29	18	11	38
1,25 mM K 14°C	14	8	6	43
1,25 mM K 23°C	13	3	10	77
1,0 μM T 23°C	8	7	1	13
5,0 μM T 23°C	5	3	2	40
Średnia	74	42	32	43

4. Dyskusja

Ze względu na rzadkie występowanie spontanicznej diploidyzacji podczas rozwoju gynogenicznych roślin cebuli, efektywna metoda podwojenia liczby chromosomów ma priorytetowe znaczenie w dalszym wykorzystaniu tych roślin w hodowli odmian mieszańcowych. Prezentowana w pracy technika duplikacji genomu za pomocą kolchicyny w warunkach *in vitro* była opisana wcześniej przez kilku autorów (3,6). Do tej pory jednak nie użyto trifluralinu dla podwojenia garnituru chromosomowego u cebuli. W porównaniu do powszechnie stosowanej kolchicyny, trifluralin wykazuje lepsze powinowactwo do tubulin roślinnych (białka wrzeczona kariokinezytycznego) *in vitro* w niskich (μM) stężeniach (8-10). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że działanie trifluralinu i kolchicyny na efektywność podwojenia genomu jest porównywalne, natomiast zastosowanie kolchicyny wpływa mniej toksycznie na regenerację eksplantatów. Niską przeżywalność tkanki kalusowej po zastosowaniu trifluralinu opisał także Wan i wsp. (9) u kukurydzy. Współczynnik podwojenia dla kolchicyny uzyskany w tej pracy jest porównywalny do wyników Geoffriau i wsp. (7) i Campion i wsp. (6). Należy jednak podkreślić, że stężenia kolchicyny użyte w naszych doświadczeniach były kilkukrotnie niższe. W przeprowadzonych eksperymentach nie potwierdzono faktu opisanego przez Saisingtong i wsp. (11) o znacznej redukcji toksyczności kolchicyny w niższych temperaturach. Zdolność do rege-

neracji była podobna zarówno, gdy eksplantaty umieszczano w temperaturze 14 jak i 23°C.

Uzyskane wyniki nie są w pełni jednoznaczne i zadowalające dlatego wdrożenie tej techniki diploidyzacji do praktyki wymaga dalszej optymalizacji.

Literatura:

1. Keller J. E. R., Korzun L., (1996), in: *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., Vol. 3, 51-75, Kluwer Academic Publishers.
2. Bohanec B., Jakše M., Ihan A., Javornik B., (1995), *Plant Sci.*, 104, 215-224.
3. Geoffriau E., Kahane R., Rancillac M., (1997b), *Euphytica*, 94, 37-44.
4. Jakše M., Bohanec B., Ihan A., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 934-938
5. Muren R., (1989), *Hort. Sci.*, 24(5), 833-834.
6. Champion, B., Perri E., Azzimonti M. T., Vicini E., Schiavi M., (1995), *Plant Breeding*, 114, 243-246.
7. Geoffriau E., Kahane R., Bellamy C., Rancillac M., (1997a), *Plant Sci.*, 122, 201-208.
8. Hansen N. J. P., Andersen S. B., (1996), *Euphytica*, 88, 159-164.
9. Zhao Jiping, Simmonds Daina H., (1995), *Phys. Plant.*, 95, 304-309.
10. Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 81, 205-211.
11. Saisingtong S., Schmid J. E., Stamp P., Büter B., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1017-1023.