Prace wstępne nad produkcją triploidalnych buraków cukrowych (*Beta vulgaris* L. v. *saccharifera*)

Preliminary experiments in producing triploid sugar beets

M. PIOTROWICZ

WSTĘP

W 1950 roku Stacja Selekcji Roślin w Górcie Narodowej koło Krakowa zaplanowała w ramach prac hodowlanych uzyskanie triploidalnych typów buraków cukrowych. Buraki cukrowe, będące powszechnie w uprawie, są diploidami. Liczbę chromosomów $2n = 18$ dla rodzaju *Beta* ustalił W i n g e (1917), a następnie K u ź m i n a (1927). Badania cytologiczne nad hodowanymi w Polsce burakami cukrowymi przeprowadzała P r y w e r (1931).

Triploidalne typy ($2n = 27$) odznaczają się w stosunku do diploidów zwiększonymi rozmiarami korzenia przy równoczesnym utrzymaniu dobrego procentu cukru, co jest ważne dla uzyskania wyższych plonów z hektara. Wielkość korzeni tetraploidów ($2n = 36$) odpowiada w przybliżeniu wielkości korzeni form diploidalnych (tabl. I, fig. 9—11). Triploidalne formy nie dają się rozmnażać z nasion ze względu na prawie całkowitą bezpłodność i niejednolite potomstwo. Wychodowanie ustabilizowanego typu triploidalnego jest zatem niemożliwe. Triploidalne nasienie buraków cukrowych należy produkować każdorazowo na drodze krzyżowań tetraploidów z diploidami.

W pierwszym etapie pracy chodziło o uzyskanie tetraploidów jako materiału hodowlanego, z którego stale na drodze krzyżówek z diploidami będzie się produkowało triploidy. Nasiona triploidalne otrzymano po raz pierwszy na tej drodze w Górcie Narodowej jesienią 1953 r. Praca nad otrzymaniem form triploidalnych obejmowała następujące etapy:

- 1) eksperymenty nad podwyższaniem liczby chromosomów,
- 2) analiza cytologiczna otrzymanych typów,
- 3) przygotowanie materiału do krzyżówek,
- 4) przeprowadzenie krzyżówek pomiędzy diploidami a tetraploidami,
- 5) sprawdzenie wyników krzyżówek.

EKSPERYMENTY NAD PODWYŻSZANIEM LICZB CHROMOSOMÓW

Jak wiadomo, podwyższanie liczb chromosomów u roślin daje się osiągnąć bodźcami różnego typu, np. działaniem substancji chemicznych, szoków termicznych, naświetlaniem promieniami Roentgena.

W celu uzyskania poliploidalnych buraków cukrowych na Stacji Selekcji Roślin w Górcie Narodowej poddano materiał działaniu kolchicyny. Stosowano tu kilka metod. Traktowano roztworami kolchicyny siewki buraków, główki wysadków, jak również pędy kwiatowe.

1. Kolchicynowanie siewek. Młode roślinki w okresie wschodów kolchicynowano w szklarni. Na stożki wzrostu między małymi jeszcze liśćmi dawano kroplę roztworu wodnego kolchicyny o stężeniu 0,2—0,5 procent. Stosowano również opryskiwanie roślinek w stadium dwóch liści 0,2 procentowym roztworem wodnym kolchicyny. Jako rezultat tych zabiegów otrzymano kilka okazów, które cechowała postać karłowata, liście silnie pomarszczone, bardziej mięsiste niż u diploidalnych form kontrolnych. Komórki szparkowe tych form były 2—3 razy większe niż u diploidów, co wskazywało na wysoki stopień poliploidalności w badanych tkankach. Jednakże zmiany dotyczyły tylko zewnętrznych tkanek i były zmianami nietrwałymi. W następnych liściach wyraźnie malała ilość grup komórek poliploidalnych i zaznaczał się powrót do typu diploidalnego. Okazy te zginęły w pierwszym sezonie wegetacyjnym.

2. Kolchicynowanie wysadków. Przed rozwojem pędów stosowano smarowanie główek wysadków 1% i 2% roztworem kolchicyny w agarze (wg metody duńskiej). Jednakże i ta metoda nie dała pozytywnych rezultatów.

3. Kolchicynowanie pędów kwiatowych. Stosowano tu dwie metody: a) opryskiwanie młodych pączków kwiatowych w okresie mejozy 0,2% roztworem kolchicyny, b) zanurzanie na trzy dni szczytowych części pędów (wg metody stosowanej w Svalöf) w 2% roztworze wodnym kolchicyny, umieszczonym w probówce; wszystkie inne rozgałęzienia odnośnych pędów obcinano. Część pędu, która była zanurzona w płynie, zazwyczaj ginęła, jednakże z pączków poniżej części kolchicynowanej rozwijały się nowe pędy kwiatowe. Powstałe z tych pędów kwiaty zawierały pewien procent nasion poliploidalnych.

Powyższe zabiegi wykonane zostały latem 1951 i 1952 roku przez dra A. Bajera i mgra J. Fieduszkę.

ANALIZA CYTOLOGICZNA UZYSKANYCH TYPÓW

W początkowym okresie mojej pracy, w roku 1952, otrzymane próbki nasion buraków cukrowych wysiałam na bibule na szalkach Petriego w celu otrzymania z nich korzonków do badań cytologicznych. Stwier-

dziłam, że w materiale tym występuje pewna ilość roślin poliploidalnych (triploidy i tetraploidy). Wobec tego wiosną 1952 roku otrzymane nasiona wysiano w pólku selekcyjnym jako materiał do selekcji metodą cytologiczną. Jesienią 1952 roku rozpoczęłam prace nad określaniem liczby chromosomów w otrzymanych z wyżej wymienionych nasion korzeniach buraków cukrowych.

Metody. Dla orientacji początkowo posługiwałam się rozmazami robionymi na młodych liściach metodą nigrozynową wg Rosena oraz metodą aceto-karminową lub orceinową wg Rosena na stożkach wzrostu korzonków.

W toku pracy wyłoniły się znaczne trudności. Wielkość chromosomów w obrębie jednego typu kariologicznego wykazuje znaczne wahania, częstym zjawiskiem było łączenie się długich chromosomów oraz stłaczanie się ich w płytce, co utrudniało liczenie. Szczególną trudność jednak nastęrczało zjawisko spontanicznego występowania podwojonych liczb chromosomów w pewnych partiach korzeni.

Ponieważ selekcionowany materiał miał być następnie użyty do rozmnożeń i do krzyżówek, sprawą pierwszorzędnej wagi stało się dla nas, aby liczby chromosomów były ustalane z całkowitą dokładnością, czego stosowane metody rozmazów nie gwarantowały. Pomimo iż metoda rozmazów jest szybsza, gdyż przy dużej wprawie — jak podaje R o s e n — mogła skrócić pracę do 5 razy, konieczne było przejście w tej serii prac na metody robienia trwałych preparatów mikrotomowych, dających ciągle serie skrawków.

Wysadki buraczane, przeznaczone do badań cytologicznych, przechowywano w kopcu. Począwszy od grudnia przenoszono je partiami (po 20 do 30 sztuk) do pomieszczenia o temperaturze około 18°C i sadzono w wilgotnym piasku. Po 7 do 10 dniach wzdłuż bruzd pojawiały się korzonki. Utrwalano je po osiągnięciu 0,5—1 cm długości.

Wielkie ułatwienie przy określeniu typu chromosomowego dawało stosowanie szoków termicznych (oziebieńnię korzonków) przed utrwaleniem. Dzięki tej metodzie osiągałam znaczne kurczenie się chromosomów, co ułatwiałło liczenie. Przez utrwalaniem, dla osiągnięcia skurczenia się chromosomów, rośliny poddano wtórnemu oziebieńnię przez umieszczenie ich na 2—3 godziny na balkonie (—1° — +2°), lub w zimnej wodzie bieżącej (+2 — +5). Jeśli zabieg trwał krócej, silne skurczenie chromosomów następowało tylko w zewnętrznych warstwach korzonków. Wyniki stosowanych zabiegów przedstawione są na załączonych rysunkach (fig. 1—6) oraz mikrofotografiach (tabl. II, fig. 12, 13, 14).

Największą ilość metafaz znajdowałam w materiale utrwalanym między 11—13 godziną zimą, a 10—12 godziną wiosną i latem.

Do utrwalania stosowałam rozcieńczony wodny utrwalacz Navashina. Odwadniałam część materiału alkoholem etylowym, część zaś dioxanem,

co znacznie przyspieszało proces zatapiania w parafinie. Skrawki o grubości 10 μ barwiłam fioletem gencjanowym wg metody Newtona.

Fig. 1—6. Metafazy somatyczne ze stożków wzrostu korzonków buraków cukrowych, 1, 2 — płytki diploidalne; 3, 4 — triploidalne; 5, 6 — płytki tetraploidalne, 2, 4, 6 — chromosomy skurczone wskutek oziębienia. Pow. 3700 $\times$ Root-tip metaphases of the three chromosomic types of sugar-beets, 1, 2 — of diploids 3, 4 — of triploids, 5, 6 — of tetraploids; in 2, 4, 6 the chromosomes are notably shortened after cooling (3700 $\times$)

Liczbę chromosomów ustalałam dla każdego osobnika na podstawie sześciu płytek metafazowych. Otrzymane wyniki sprawdzałam następnie jeszcze na 6—8 korzonkach tej samej rośliny.

W pracy posługiwałam się następującą optyką: okular Zeissa 10 $\times$, obiektyw immersyjny Zeissa 90 $\times$. Rysunki wykonałam spod aparatu rysunkowego Zeiss-Abbe. Mikrofotografie wykonałam przy tej samej optyce. Powiększenia podane są pod odnośnymi figurami.

Wyniki analizy cytologicznej korzeni buraczanych. Praktycznym celem moich badań było wychwycenie jak największej ilości tetraploidalnych korzeni buraków, których część przeznaczona była na rozmnożenie i uzyskanie większej ilości nasion tetraploidalnych, część zaś potraktowano jako materiał do próbnych krzyżówek z diploidami.

Zimą 1952/53 roku oraz 1953/54 roku przebadłam łącznie 353 korzenie buraków cukrowych. Znalazłam w tym materiale 83 diploidy, 188 triploidów, oraz 82 tetraploidy (tabela 1, fig. 9—11).

Należy zaznaczyć, że na podstawie zestawienia w tabelce 1 nie można wyciągać wniosków co do procentu występowania poszczególnych typów chromosomowych w badanym materiale, gdyż po stwierdzeniu

zależności między typem chromosomowym z jednej strony a kształtem i wielkością korzenia z drugiej, usiłowałam wybierać do badań cytologicznych tylko te formy, które przypuszczalnie stanowiły typ 36 chromosomowy. Niewątpliwie materiał badany zawierał o wiele więcej triploidów, natomiast występowanie tetraploidów było stosunkowo radsze.

W badanym materiale nie spotkałam ani razu form aneuploidalnych często występujących po traktowaniu roślin promieniami Roentgena. Stwierdzenie tego faktu ułatwiło i przyspieszyło dalsze badania cytologiczne.

Tabela 1

Zestawienie typów chromosomowych w drugorocznym materiale

Typ chrom.	Ilość osobników poszczególnych typów	Ilość okazów wykazujących podwojenie 1. chrom.	%
Diploidy $2n=18$	83	5	6,0
Triploidy $2n=27$	188	3	1,6
Tetraploidy $2n=36$	82	1	1,2
Łącznie ilość przebadanych okazów	353	9	2,6

Stosowanie metody cytologicznej do określenia typu chromosomowego jest pracą bardzo długą i żmudną, nie dającą się zastosować na szerszą skalę. Dlatego dla selekcji materiału hodowlanego ważna byłaby możliwość powiązania poszczególnych typów chromosomowych z dającymi się łatwo stwierdzić cechami anatomicznymi, morfologicznymi czy fizjologicznymi, występującymi w pierwszym roku wegetacji. Najczęściej używanymi kryteriami jest pokrój rośliny, wielkość komórek (praktycznie bierze się pod uwagę wielkość komórek szparkowych lub średnicę ziarn pyłku). Na tej zasadzie można materiał orientacyjnie posegregować na grupy i przebadać cytologicznie tylko okazy przedstawiające domniemany typ tetraploidalny. Próbowalam powiązać stopień poliploidalności buraków cukrowych z następującymi cechami: a) szybkością kiełkowania, b) pokrojem rośliny, c) wielkością komórek szparkowych, d) kształtem komórek skórki liścia, e) pokrojem rośliny.

a) Nieznaczną różnicę w szybkości kiełkowania nasion poszczególnych typów chromosomowych można było zauważyć na wysianych w pracowni na szalkach Petriego kłębkach buraczanych. W temperaturze 20°C kiełkowanie jest szybkie i rozpoczyna się u diploidalnych form już na trzeci dzień. Triploidy i tetraploidy kiełkują o pół lub o jeden dzień później niż diploidy. Różnica kiełkowania między tri- a tetraploidami jest bardzo nikła. Tendencję do wcześniejszego kiełkowania wykazują raczej kłębki triploidalne. Na tej zasadzie można tylko orientacyjnie stwierdzić w badanym materiale obecność form diploidalnych. Różnice szybkości kiełkowania nie mogą zatem służyć za kryterium odróżnienia typów tri- i tetraploidalnych (tabela 2).

b) Następną praktycznie ważną cechą, związaną z liczbą chromosomów, jest morfologia korzenia. Triploidalne formy odznaczają się zwiększonymi wymiarami i znaczną grubością korzenia, natomiast korzenie zarówno diploidów, jak i tetraploidów są mniejsze, znacznie wydłużone. Na

Tabela 2
Wyniki rozmnożeń i krzyżówek

Materiał wyjściowy	Początek kiełkowania	% kiełkowania	Ilość okazów przeanalizowanych cytologicznie	L. chrom. (2n)			Uwagi
				18	27	36	
Tetraploidy w izolacji	po 4 dniach	44	18	—	—	18	Nasiona duże, wyrównane
Triploidy w izolacji	4	5	8	6	2	—	Duża rozpiętość w wielk. nasion
Diploidalne rośliny z podwojeniami	4	45	7	5	1	1	Możliwość krzyżowania obu typów, które rosły razem w szklarni
Tetraploidalne rośliny podwojeniami	4	38	8	1	6	1	
Tetrapl. X dipl. PLR	4	50	16	—	16	—	Równoczesne wytwarzanie pędów kwiatowych u obu roślin
Dipl. PLR X tetrapl.	3	60	12	12	—	—	
Dipl. CLR X tetrapl.	3	60	10	7	3	—	
Dipl. MLR X tetrapl.	4	50	8	7	1	—	wcześniejszy rozwój pędów kwiat. u tetrapl.
Dipl. NPLR X tetrapl.	2	75	12	12	—	—	

podstawie pokroju trudno te dwa typy od siebie odróżnić (tabl. I, fig. 9—11).

Jak zaznaczyłam już poprzednio, przeprowadzona przeze mnie selekcja miała na celu wychwycenie osobników tetraploidalnych. Opierając się na powyższych różnicach, z mieszaniny typów odrzuciłam większość osobników triploidalnych, co pozwoliło na szybsze znalezienie tetraploidów wśród pozostałych roślin. W pierwszych partiach użytych do badań—bez uprzedniej eliminacji domniemanych triploidów—otrzymywałam trzy, dwa, a czasem jeden tetraploid na dwadzieścia badanych roślin. W ostatnich partiach, w których uwzględniałam korelację kształtu korzenia z liczbą chromosomów odrzucając domniemane triploidy, doszłam do ośmiu tetraploidów na dwadzieścia osobników.

c, d, e) Pokrój rośliny, kształt komórek, wielkość komórek szparkowych nie okazały się tu dobrymi kryteriami do identyfikowania typów chromosomowych. Pozostaje to na pewno w związku z faktem, że po prze-

kroczeniu triploidalnej liczby chromosomów, która odpowiada najbujniejszemu typowi rośliny, nie następuje dalsze zwiększanie się bujności, a nawet przeciwnie — daje się obserwować jej spadek.

W drugim roku wegetacji uchwyciono cechę wykazującą wyraźną współzależność z liczbą chromosomów. Jest nią długość średnicy ziarn pyłku. Analiza morfologiczna pyłku pochodzącego z diploidalnych, triploidalnych i tetraploidalnych form pozwoliła stwierdzić różnice w wielkości oraz w procencie wykształcenia płodnych ziarn. Zarówno diploidy,

Fig. 7. Wykresy średnicy ziarn pyłku u trzech typów chromosomowych
Graphs of pollen-diameters of the three chromosomic types

jak i tetraploidy mają pyłek dobrze wykształcony, prawie całkowicie płodny, w obrębie typu chromosomowego jednolity. Oba te typy chromosomowe wyraźnie różnią się między sobą wielkością (tabl. II, fig. 7). Średnia arytmetyczna (M) pyłku haploidalnego, pochodzącego z diploidalnych form buraków cukrowych, wynosi $19,6\mu$, a wahania leżą w granicach $14-26\mu$. Jak wykazuje wykres, wartość modalna (M_o) wynosi $21,5\mu$.

Pyłek diploidalny tetraploidów wykazuje skalę wahań od 14 do 32μ . Średnia arytmetyczna (M) wynosi $27,2\mu$. Wartość modalna (M_o) wynosi $27,5\mu$.

Natomiast pyłek pochodzący z okazów triploidalnych jest w przeważnej części zdegenerowany. Pod mikroskopem widać — szczególnie wyraź-

nie po zabarwieniu aceto-karminem — liczne ziarna zniekształcone, bez żywej treści. Ziarna płodne są nieliczne, charakteryzują się dużą rozpiętością wielkości, średnica ich waha się w granicach 14—32 μ . Skala zmienności ziarn zdegenerowanych wynosi 8—32 μ . Różnica w wielkości ziarn pyłku i ich płodności może być zatem wykorzystana w celu odróżnienia form diploidalnych, triploidalnych oraz tetraploidalnych buraków cukrowych (tabela 3, fig. 7, 8).

Fig. 8. Wykresy średnicy płodnych (a) i bezpłodnych (b) ziarn pyłku triploidalnych buraków cukrowych (c — wykres ogólny)
Graphs of diameters of viable (a) and sterile (b) pollen grains of triploid sugar beets; c — total graph

Odróżnienie form poliploidalnych na podstawie analizy morfologicznej ziarn pyłku jest szybkie, łatwe i dość pewne. Dzięki temu metodę tę można będzie zastosować praktycznie przy ostatecznym sprawdzaniu materiału wyjściowego buraków, branych z rozmnożeń tetraploidów do krzyżówek z diploidami.

Zaznaczam, że wielkość ziarn pyłku nie jest wielkością stałą. Zależy ona od koncentracji płynu, w którym analizujemy (gliceryna, aceto-karmin), oraz czasu, w jakim badamy pyłek od chwili włożenia go do danego środowiska. Pomiarów dokonałam na preparatach w glicerynie.

Reasumując wyżej wymienione zależności stwierdzić trzeba, że jedyną całkowicie pewną metodą oznaczania stopnia poliploidalności korzeni buraków cukrowych, jest analiza cytologiczna. Metodę pomocniczą

Tablica I.

Fig. 9—11. Fotografie korzeni buraków cukrowych. 9 — typ diploidalny; 10 — typ triploidalny; 11 — typ tetraploidalny. Ok. 1/5 wielk. naturalnej

Plate I.

Fig. 9—11. Photos of roots of sugar-beets: 9 — of diploids, 10 — of triploids, 11 — of tetraploids, c. 1/5 nat. size

TABLICA I — PLATE I

Tabela 3
Zestawienie średnicy ziarn pyłku diploidów, triploidów i tetraploidów

Nr rośliny	Typ chrom. (2n)	płodności	Średnica ziarn pyłku w mikronach								n	M
			8	11	14	17	20	23	26	29—32		
1	18				2	71	115	12			200	19.6
2					1	18	156	25			200	
3						14	152	34			200	
4					2	19	155	24			200	
5					5	41	139	15			200	
Ogółem		100			10	163	717	110			1000	
6a	27	płodne				16	96	25	47		184	
7a						1	55	27	50		133	
8a						8	100	14	57		179	
9a					1	15	85	1	22	2	126	
10a						12	30	10	11		63	
		Ogółem			1	52	366	77	187	2	685	
6b		zdegenerowane	2	5	4	2		2	1		16	
7b				8	7	18	24	10			67	
8b			1	2	4	9	2	3			21	
9b			7	8	20	18	11	10			74	
10b			5	8	46	37	32	9			137	
		Ogółem	15	31	81	84	69	34	1		315	
Ogółem		69	15	31	82	136	435	111	188	2	1000	
11	36				1	1	8	81	101	8	200	27.2
12							4	28	137	31	200	
13					1	3	8	30	110	48	200	
14							3	42	130	25	200	
15								36	148	16	200	
Ogółem		99,4			2	4	23	217	626	128	1000	

o dużej pewności, ale dającą się zastosować dopiero w drugim roku wegetacji, stanowić może badanie pyłku.

Jak wynika z tabeli 1, w przebadanym materiale buraków kolchicynowych stwierdziłam, że w tkankach dziewięciu korzeni buraków cukrowych sporadycznie występują grupy komórek o podwojonych liczbach chromosomów. Komórki z podwojoną liczbą chromosomów można było znaleźć w każdym z trzech typów chromosomowych. Najczęściej występowały one u form diploidalnych, przy czym u trzech osobników jako podwojenie kompleksu chromosomowego w całym korzonku diploidów, u dwóch innych zaś — w postaci grup komórek tetraploidalnych, rozsiadanych wśród tkanek diploidalnych.

Dalsze zjawiska podwajania kompleksów chromosomowych stwierdziłam u trzech okazów triploidalnych, u których wykryłam w korzonkach komórki heksaploidalne. Również u jednego okazu tetraploidalnego obserwowałam grupy komórek oktoploidalnych w dwóch jego korzonkach. Jak wykazuje tabela 1, częstość występowania uwielokrotnień zmniejsza się wraz ze stopniem poliploidalności. Partie o podwojonych liczbach chromosomów obejmowały stosunkowo niewielkie liczby komórek. W przeciwieństwie do dwuletnich korzeni buraków cukrowych, w korzonkach siewek nie znalazłam ani razu podwojonej liczby chromosomów.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO KRZYŻÓWEK

Przebadany pod względem cytologicznym materiał przechowywano w kopcu aż do pory sadzenia. Diploidy kwitną o parę dni wcześniej niż tetraploidy. W celu wywołania równoczesnego zakwitania obu typów konieczne było wysadzenie tetraploidów do gruntu wcześniej lub przyspieszenie ich kwitnienia za pomocą wyższej temperatury w szklarni. Część wysadków buraków tetraploidalnych sadziłiśmy w całości, większe z nich krawaliśmy na pół.

PRZEPROWADZANIE KRZYŻÓWEK POMIĘDZY DIPLOIDAMI A TETRAPLOIDAMI

Okazy przeznaczone do krzyżowania sadzono w szkółkach grupami złożonymi z dwóch brzeżnych rzędów diploidów i jednego rzędu tetraploidów, umieszczonego pomiędzy nimi. Ponieważ burak jest wiatropylny, dla zabezpieczenia przed zanieczyszczeniem obcym pyłkiem stosowano izolację przestrzenną oraz izolację z konopi. W taki sposób utworzono warunki, w których oba typy chromosomowe miały znaczne szanse krzyżowania się między sobą.

Tetraploidy krzyżowaliśmy ze wszystkimi diploidalnymi typami naszej hodowli (CLR, PLR, MLR, NPLR). Nasiona z form diploidalnych i tetraploidalnych zebrano osobno.

Przygotowaniem i przeprowadzeniem krzyżówek zajmował się inż. K. S z o s t e k.

WYNIKI PRZEPROWADZONYCH ZABIEGÓW

Jesienią 1953 roku zebrano nasiona z krzyżówek i rozmnożeń buraków tetraploidalnych oraz tych okazów diploidalnych i tetraploidalnych, które wykazywały w swych tkankach podwojenia liczby chromosomów. Dla skontrolowania wyników metodą cytologiczną wysiałam nasiona na szalkach Petriego. Liczbę chromosomów ustalałam na podstawie podziałów w stożkach wzrostu korzeni, pochodzących bezpośrednio z kłąbów.

1) Wyniki krzyżówek:

Krzyżówki przeprowadzone między czterema formami diploidalnymi naszej hodowli (CLR, MLR, PLR, NPLR) a tetraploidami dały wyniki niejednakowe (tabela 2).

Przy użyciu jako organizmów macierzystych roślin diploidalnych krzyżowanie nastąpiło tylko u typów CLR i MLR, przy czym procent otrzymanych triploidów był mały. Krzyżowanie typów NPLR i PLR z tetraploidami w ogóle nie nastąpiło. Na nieudanie się krzyżówki z typem NPLR wpłynął fakt niezupełnie równoczesnego kwitnienia obu typów chromosomowych, co nie zaszło przy krzyżówce PLR z tetraploidami.

Wyniki krzyżowania PLR z tetraploidami okazały się specjalnie interesujące i ważne. Pozwoliły stwierdzić różnice w zależności od kierunku krzyżowania. Oczekiwany wynik otrzymaliśmy tylko wówczas, gdy jako organizmów macierzystych użyto form tetraploidalnych. Analiza cytologiczna stwierdziła w potomstwie same formy triploidalne. Niestety, jest to jedyna krzyżówka, w której tetraploidy były organizmami macierzystymi.

2) Uzyskiwanie tetraploidalnych nasion buraków cukrowych:

Wiosną 1953 roku wysadziliśmy część tetraploidalnych korzeni buraczanych w celu otrzymania z nich nasion. W czasie kwitnienia zbadałam u znacznej ilości okazów wielkość ziarn pyłku. Pyłek był jednolity, płodny w 99,5%, ziarna były duże o średnicy wahającej się w granicach 17—32 μ . Średnia wielkość pyłku (M) wynosiła 27 μ . Najczęściej spotykanymi formami (Mo) były pyłki o średnicy 27,5 μ . Rozmiary ziarn pyłków były zatem typowe dla tetraploidów, co pozwalało przypuszczać, że nasiona otrzymane z tych buraków będą stanowiły wyłącznie formy 36 — chromosomowe. Jesienią zebraliśmy z tych roślin około pięciu kg nasion. Kłębki buraków tetraploidalnych są duże, o wyrównanej wielkości (tablica III, fig. 18—20). Procent kiełkowania w stosunku do diploidów jest niski, gdyż wysiane kłębki kiełkowały na szalkach w 44%, normalne zaś kłębki buraków cukrowych diploidalnych kiełkowały w 75—80% (do kiełkowania użyto kłębków nie sortowanych). Sprawdzenie typu metodą cytologiczną wykazało istotnie, że w potomstwie wystąpiły formy 36 — chromosomowe. Skontrolowany w ten sposób materiał może być zatem użyty w następnych latach do krzyżówek z formami diploidalnymi do produkcji nasion buraków triploidalnych.

3) Badania potomstwa miksoploidalnych typów buraków cukrowych:

Oddzielnie wysadzono dwa osobniki: jeden diploidalny i jeden tetraploidalny. Wykazywały one w tkankach korzonków komórki z podwojonymi liczbami chromosomów.

U roślin potomnych diploida, u którego stwierdzono wymienione odchylenia, występowały liczby chromosomów 18, 27, 36.

Okaz tetraploidalny z grupami komórek oktoploidalnych wydał natomiast rośliny potomne, wśród których znalazłam typy tri- i tetraploidalne.

Triploidy, które wystąpiły w potomstwie tych obu roślin, przypuszczalnie powstały w wyniku krzyżowania, ponieważ oba osobniki rosły w tej samej szklarni. Natomiast występowanie w potomstwie diploidów roślin 36-chromosomowych dowodzi, że roślina taka ma zdolność wykształcenia gamet o nie zredukowanej liczbie chromosomów. Występowania oktoploidów w potomstwie tetraploida nie stwierdziłam. Szanse powstania takiego typu są znacznie mniejsze niż 36-chromosomowego u buraków diploidalnych.

4) Triploidy:

Triploidalne buraki cukrowe wysadzono w izolacji. Charakteryzują się one znacznym procentem zdegenerowanego pyłku (31%). Średnica ziarn pyłku z treścią żywą wykazuje szeroką skalę wahań (od 14 do 32 μ), w której mieszczą się wymiary ziarn pyłku odpowiadające zarówno pyłkowi diploidów, jak i tetraploidów (fig. 8). Na wykresie przedstawiającym frekwencję poszczególnych klas wielkości płodnych ziarn pyłku zaznaczają się dwa wierzchołki, z których jeden odpowiada ziarnom pyłku diploidów (21,5 μ), a drugi ziarnom typu tetraploidów (27,5 μ). Jak widać z wykresu, pierwsza klasa występuje liczniej.

Triploidalne formy wydały nieliczne nasiona o znacznych różnicach wielkości. Stwierdziłam wśród nich dużą ilość form niedorozwiniętych (tablica III, fig. 18). Kiełkowało zaledwie 5%. Potomstwo pod względem cytologicznym było niejednorodne. Stwierdziłam w nim występowanie typów 18, 27 i 36-chromosomowych.

DYSKUSJA

Otrzymane w toku niniejszych badań wyniki mogą mieć znaczenie przy pracach cytologiczno-hodowlanych, które wiążą się ze sprawą krzyżowania roślin różniących się liczbą chromosomów. Pragnę zwrócić uwagę hodowców na ich praktyczne zastosowanie.

Na pierwszy plan wysuwają się tu dwa zagadnienia:

- 1) rozwój nasion uzyskanych na drodze krzyżówek generatywnych między formami di- a tetraploidalnymi,
- 2) spontaniczne podwajanie liczby chromosomów w poszczególnych tkankach organizmów.

Zagadnienia te mają ogromne znaczenie dla wypracowania metod produkcji triploidalnych buraków cukrowych.

- 1) Rozwój nasion uzyskanych na drodze krzyżówek generatywnych między formami di- a tetraploidalnymi:

Ciekawe i dające pewne metodyczne wskazówki są rezultaty krzyżówek, przeprowadzanych w dwóch kierunkach między diploidami PLR a tetraploidami. Analiza cytologiczna korzonków wziętych bezpośrednio z kłębków pozwoliła stwierdzić, że oczekiwane formy triploidalne otrzymano w potomstwie tetraploidów, w potomstwie zaś użytych do krzyżówek organizmów diploidalnych wystąpiły prawie wyłącznie diploidy. Pomyślny rezultat zależał zatem od kierunku krzyżowania i osiągnięto go, gdy jako macierzystych użyto roślin z wyższą liczbą chromosomów, a diploidów — jako organizmów ojcowskich.

Fakt udawania się krzyżówek pomiędzy diploidami a tetraploidami buraków cukrowych w zależności od tego, który z typów wybierano jako organizm macierzysty, zgodny jest z wynikami doświadczeń i prac badawczych M ü n t z i n g a (1930, 33), S k a l i ŋ s k i e j (1937) i W a t k i n s a (1932), którzy dokładnie omawiają to zagadnienie.

W doświadczeniach S k a l i ŋ s k i e j (1937) nad krzyżowaniem diploidalnych typów *Aquilegia* z tetraploidem *A. Janczewskii* nasiona na ogół nie rozwijały się w krzyżówkach typu $2x \times 4x$ (*A. flabellata* $\times$ *A. Janczewskii*), z krzyżówek przeciwnych zaś, gdzie organizmem macierzystym była forma tetraploidalna *A. Janczewskii* ($4x$), otrzymano mieszańce triploidalne.

Jak wiadomo, różnice w liczbie chromosomów mogą utrudniać krzyżowanie. Na ogół krzyżowanie udaje się najlepiej między formami o jednakowych liczbach, na przykład między diploidalnymi formami buraków cukrowych. Haploidalne ziarna pyłku najlepiej kiełkują na znamieniu roślin diploidalnych. Wtedy tkanka znamienia ma $2x$, a kiełkująca na niej łagiewka $1x$, co charakteryzuje normalny stosunek tkanek rośliny macierzystej do gametofitu męskiego.

W przypadku, gdy organizmem macierzystym jest diploid ($2n = 18$), a męskim tetraploid ($2n = 36$), tkanka słupka i łagiewka mają tę samą liczbę chromosomów zamiast normalnego stosunku $2:1$, występuje tu więc stosunek $1:1$, który u licznych roślin stanowi przeszkodę do kiełkowania łagiewki.

Zalążki roślin diploidalnych przeważnie rozwijają się wcześniej, a łagiewki pyłkowe tetraploidów opóźniają się w rozwoju na ich znamionach, zatem w większości wypadków nie są zdolne do skutecznego zapłodnienia.

Gdy organizmem macierzystym jest tetraploid ($2n = 36$), a ojcowskim — diploid ($2n = 18$), normalny stosunek liczb chromosomów znamienia do łagiewki pyłkowej również ulega zakłóceniu i wynosi $4:1$. Jednakże wyższa liczba chromosomów w organizmie macierzystym jest mniejszą przeszkodą do kiełkowania łagiewki niż jednakowe liczby tkanek słupka i łagiewki (M ü n t z i n g, 1933).

W dalszym etapie rozwojowym odgrywa rolę wzajemny stosunek zarodka, endospermy, oraz organizmu macierzystego. Normalnie u form diploidalnych wynosi on $2 : 3 : 2$.

W konsekwencji krzyżowania tetraploidów z diploidami powstają zarodki triploidalne i endosperma z pięcioma kompleksami chromosomowymi; cztery z nich wniesione są przez jądro bielmowe, a tylko jedno przez drugie jądro plemnikowe łagiewki (pierwsze zapładnia komórkę jajową). Stosunek zarodka, endospermy i organizmu macierzystego jest w tym przypadku $3 : 5 : 4$. Takie załączki mają pewne szanse rozwoju, chociaż znaczna ich ilość może się zdegenerować.

W konsekwencji zapylania diploidów pyłkiem pochodzącym z roślin tetraploidalnych powstają niekiedy również triploidalne zarodki, ale endosperma ma tu cztery kompleksy (dwa z jądra bielmowego woreczka załączkowego oraz dwa z drugiego jądra plemnikowego, pochodzącego z rośliny tetraploidalnej). Stosunek wynosi tu $3 : 4 : 2$. W tych przypadkach zachodzić może częściej upośledzenie rozwoju endospermy i w konsekwencji zarodek może ulec zagłodzeniu (C o o p e r i B r i n k, 1945).

Zjawiska powyższe dają ważne wytyczne do planowania krzyżówek pomiędzy typami diploidalnymi i tetraploidalnymi buraków cukrowych. Jako organizmy macierzyste do tych krzyżówek należy brać rośliny tetraploidalne.

2) Spontaniczne podwajanie liczb chromosomów w poszczególnych tkankach organizmów:

W przebadanym przeze mnie materiale korzeni buraków cukrowych stwierdziłam u pewnych osobników występowanie w obrębie jednego organizmu obok normalnej liczby chromosomów podwojoną ich liczbę (18—36, 27—54, 36—72). Zjawisko takie poprzednio opisał L e v a n (1938), który stwierdził w materiale korzeni buraczanych występowanie 9,6% okazów wykazujących podwojoną liczbę chromosomów w grupie komórek lub całym korzonku. Zjawisko to dawało się częściej zaobserwować u diploidów niż u form poliploidalnych: u diploidów 18,4%, u triploidów 9,8%, u tetraploidów 5,4%. W zbadanym przeze mnie materiale występowanie takich podwojeń stwierdziłam w 2,6% okazów, przy czym u diploidów osiągało ono 6,0%, u triploidów 1,6%, u tetraploidów około 1,2%.

Częstość występowania podwojeń w liczbie chromosomów tak w moim, jak i w opracowanym przez L e v a n a materiale maleje wraz ze wzrostem stopnia poliploidalności.

Liczbę chromosomów ustalałam na podstawie 6—8 korzonków z jednej rośliny. Być może, że gdyby wzięto do badań większą ilość korzonków jednego okazu, natrafionoby na większą ilość okazów z podwojeniami w liczbie chromosomów. Na ten sam fakt zwraca uwagę w swych pracach L e v a n.

W korzonkach pochodzących bezpośrednio z kłąbków buraczanych L e v a n stwierdził, że podwojenia liczb chromosomów zachodzą znacznie rzadziej (około 0,22%).

Pewne światło na zjawisko częstego występowania podwojeń liczby chromosomów w korzeniach buraczanych w przeciwieństwie do siewek rzucają wyniki badań H u s k i n s a (1949). Podwyższanie liczby chromosomów H u s k i n s wiąże z dojrzałością organu rośliny; występowanie jąder poliploidalnych zachodzi według niego jako normalne zjawisko rozwojowe w tkankach zróżnicowanych histologicznie. Jądra takie w normalnych warunkach podziałom już nie ulegają. Pobudzenie ich do podziałów ujawnia ich charakter poliploidalny.

Wyżej wymienione fakty uzasadniają konieczność ustalania liczby chromosomów dla wyjściowego materiału tetraploidów, na licznych stożkach wzrostu poszczególnych osobników buraków oraz potrzebę wielkiej dokładności w badaniach. Można ją osiągnąć na podstawie szczegółowej analizy kolejnych skrawków mikrotomowych preparatów trwałych, przy stosowaniu zaś tylko metod rozmazowych łatwo można przeoczyć fakt równoczesnego występowania u jednego osobnika 18 i 36 chromosomów. W związku z tym pragnę przypomnieć, że jeden z wysadków diploidalnych, w którym wystąpiły podwojenia liczby chromosomów, wydał w potomstwie rośliny o liczbach chromosomów 18, 27, 36 z przewagą 18. Gdyby taki wysadek na skutek niedokładności metody rozmazów został błędnie zakwalifikowany jako tetraploid o ustalonym kompleksie chromosomowym, a następnie włączony w rozmnożenia tetraploidów, nastąpiłoby zanieczyszczenie materiału hodowlanego typami di- i triploidalnymi; byłoby to równoznaczne z przekreśleniem wyników całorocznej pracy.

Należy zatem podkreślić, że pośpiech, niedokładność, jak i niedostateczna ilość przebadanych korzeni z poszczególnych roślin, wynikające z niedoceniań lub nieznamości metod cytologicznych, mogą popsuć cały materiał do rozmnożeń i krzyżówek, przygotowany zazwyczaj z wielkim nakładem czasu i pracy.

W związku z dalszą pracą nad otrzymaniem triploidalnych nasion buraków cukrowych wysuwają się dwa zagadnienia:

1) wypracowanie metod krzyżówek generatywnych między formami di- i tetraploidalnymi buraków cukrowych.

2) utrzymanie w typie chromosomowym rodów tetraploidalnych.

Wypracowanie metod krzyżowania pomiędzy formami di- i tetraploidalnymi ma na celu osiągnięcie jako efektu końcowego prawie czystego triploidalnego materiału nasiennego. Wymaga ono przeprowadzenia planowych doświadczeń, które ujawniłyby przyczyny całkowitego lub częściowego niepowodzenia w wynikach krzyżówek między formami di- i tetraploidalnymi przy użyciu diploidów jako organizmów macierzystych.

W tym celu należałoby zaplanować dwa typy doświadczeń z rozmaitymi zgrupowaniami obu typów:

a) jeden tetraploid umieścić w środku, a rzędy brzeżne obsadzić kilkoma diploidami,

b) jeden diploid obsadzić tetraploidami.

W tak zaplanowanych krzyżówkach rośliny umieszczone w środku będą potraktowane jako organizmy macierzyste. Rośliny rzędów brzeżnych należy traktować jako ojcowskie, gdyż związane przez nie nasiona będą w większości przedstawiały produkt zapyłania w obrębie jednego typu chromosomowego.

W pierwszym typie doświadczeń stwierdzimy stopień płodności tetraploidów po zapyleniu pyłkiem z diploidów, w drugim — czy diploidy mają zdolność rozwoju nasion po zapyleniu pyłkiem pochodzącym z tetraploidów.

Najważniejszą sprawą selekcji rodów tetraploidalnych ze względu na możliwość zapyłania przez typy diploidalne jest utrzymanie ich w typie chromosowym. Jak wykazały niniejsze badania, selekcję nasienników można by oprzeć na analizie morfologicznej pyłku.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, że triploidalne typy buraków cukrowych dadzą się wyprodukować na dużą skalę przy zastosowaniu odpowiednich metod cytologiczno-hodowlanych; mogą mieć one zatem ważne znaczenie praktyczne.

S t r e s z c z e n i e

W pracy niniejszej przedstawione są wyniki badań prowadzonych w Stacji Selekcji Roślin w Górcie Narodowej nad otrzymaniem triploidalnych nasion buraków cukrowych. Triploidalne buraki cukrowe ($2n = 27$) charakteryzują się zwiększonymi rozmiarami korzenia w stosunku do form diploidalnych ($2n = 18$), będących powszechnie w hodowli. Cechę tę można wykorzystać do podniesienia plonu.

Ze względu na prawie całkowitą bezpłodność form triploidalnych oraz na ich niejednolite potomstwo triploidalne nasienie buraków cukrowych trzeba produkować każdorazowo na drodze krzyżówek między formami di- i tetraploidalnymi ($2n = 36$).

Dlatego pierwszym etapem pracy nad otrzymaniem triploidalnego nasienia buraków cukrowych jest wytworzenie form tetraploidalnych jako materiału wyjściowego do krzyżówek z diploidami.

Materiał wyjściowy do niniejszych badań otrzymano przez kolchicynowanie pędów kwiatowych. Wyhodowane z uzyskanych nasion korzenie buraków cukrowych zbadałam cytologicznie. W ogólnej liczbie 353 okazów stwierdziłam 83 diploidy, 183 triploidy, 82 tetraploidy.

Stwierdziłam nadto w 9 badanych korzeniach buraków diploidalnych, triploidalnych i tetraploidalnych sporadyczne występowanie grup komórek lub całych korzonków o podwojonej liczbie chromosomów. Częstość występowania podwojeń liczby chromosomów malała wraz ze wzrostem stopnia poliploidalności. Zjawisko to opisał poprzednio *Levan* (1938).

Oprócz całkowicie pewnej metody cytologicznej do identyfikowania tetraploidów stwierdziłam, że pomocna może być analiza morfologiczna pyłku.

Z wyselekcjonowanych tetraploidów część użyto do rozmnożenia, część zaś wzięto do próbnych krzyżówek z różnymi typami diploidalnymi buraków cukrowych naszej hodowli w celu otrzymania triploidów.

Stwierdzono na podstawie przeprowadzonych krzyżówek między diploidami PLR a tetraploidami, że wyniki były różne w zależności od kierunku krzyżowania. Czyste triploidalne potomstwo otrzymano tylko wówczas, gdy jako roślin macierzystych użyto tetraploidów, a pyłek pochodził z roślin diploidalnych.

Powyższe wyniki mają znaczenie praktyczne, gdyż dają ważne wytyczne do planowania krzyżówek mających na celu wyprodukowanie triploidalnych buraków cukrowych.

Pracę niniejszą wykonano w latach 1952—1954 w C. Z. S. R., Stacja Selekcji Roślin Górka Narodowa koło Krakowa.

Inż. mgrowi *J. Fiedziuszcze* i inż. *K. Szostkowi* dziękuję za umożliwienie wykonania niniejszej pracy w Stacji Selekcji Roślin w Górcie Narodowej. Prof. dr *M. Skalińskiej*, kierownikowi Katedry Botaniki Ogólnej UJ składam gorące podziękowanie za cenne wskazówki oraz za udostępnienie mi literatury związanej z opracowywanym zagadnieniem.

*Stacja Selekcji Roślin
w Górcie Narodowej k. Krakowa*

(Wpłynęło dn. 10.VIII.1954 r.)

S U M M A R Y

The present investigations were started at the Station of Plant Selection Góra Narodowa near Kraków, with the purpose of elaborating methods of production of triploid sugar beets. This chromosomal type ($2n = 27$) has bigger roots than both the tetraploids ($2n = 36$) and the cultivated diploids ($2n = 18$); its percentage of sugar being approximately the same as in the latter type, thus its characteristics may be important for the increase of the crop.

In view of the fact the triploid sugar beets are highly sterile and give rise to non-uniform progenies, this type must be produced every year anew by crossing of diploid and tetraploid forms.

Therefore the work of obtaining triploids must be preceded by the production of tetraploid forms which would represent the initial material for crosses with diploids.

This initial material of tetraploids has been obtained by colchicine treatment of flower shoots. In the course of my work the plants grown from seeds obtained in this way were investigated cytologically. According to the results obtained by me, the total lot of 353 plants consisted of 83 diploids, 183 triploids, and 82 tetraploids.

Besides, in the tissues of 9 plants representing the diploid, the triploid and the tetraploid type, there appeared occasionally groups of cells or even whole roots with doubled chromosome numbers. The frequency of chromosome doubling in the somatic tissues decreased with the increase of the degree of polyploidy. This phenomenon has been previously described by L e v a n (1938).

At the end of the first period of vegetation the triploids distinctly differ from the two other types by their bigger roots. On the other hand, the morphological identification of tetraploid individuals which should be selected for subsequent crosses with diploids, is not easy in view of rather slight differences between this type and the diploids.

In the course of my work it could be stated that the estimation of the chromosomic type in the second year may be based on studies of the pollen in the three types, chiefly on the size difference as well as the proportion of abortive grains. Thus, besides the entirely reliable cytological method, the study of pollen samples may be also helpful for the identification of tetraploids.

Of the material selected, a part of the tetraploids was used for further propagation of this type; the remaining plants were taken for crossing with various diploid strains of sugar beets cultivated at the Station.

It is interesting to note, that the results of reciprocal crosses between the diploid strain PLR and the tetraploids were different. A pure triploid progeny was obtained only when tetraploids were used as mother plants and the pollen originated from diploids; on the other hand seeds harvested from diploid plants gave rise to a mixed progeny of diploids and triploids with a distinct prevalence of diploids.

The above observations should be taken into consideration in future experiments, for they give important hints concerning the mode of planning of crosses which would result in the production of triploids.

L I T E R A T U R A

- Cooper D. C. and Brink R. A., 1945. Seed collapse following mating between diploid and tetraploid races of *Lycopersicum pimpinellifolium*. „Genetics“, vol. 30, p. 376 — 401.
- Huskings C. L., and Steinitz L. M., 1948. The nucleus in differentiation and development II. Induced mitoses in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. „Journ. of Heredity“ 39, p. 61 — 77.
- Kuzmina N. E., 1927. On the chromosomes of *Beta vulgaris* L. „Bull. of Appl. Bot. of Gen. and Plant Breeding“ 17.

- Levan A., 1944. On the normal occurrence of chromosome doublings in secondyear root tips of sugar beets. „Hereditas“ 30, 161 — 164.
- Müntzing A., 1933. Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. „Hereditas“ 18, 1 — 2, p. 33 — 55.
- Prywer Cz., 1931. Badania cytologiczne nad burakiem cukrowym. „Acta Soc. Bot. Pol.“ vol. 8, p. 19 — 46.
- Rosen G., 1946. A rapid method for sorting polyploid material, „Hereditas“ 32, h. 1, p. 129 — 130.
- Rosen G., 1946. Chromosome determination in root-tips and leaves by the rapid orcein method, „Hereditas“ 32, h. 3 — 4, p. 551 — 554.
- Skalińska M., 1945. Cytogenetic studies in triploid hybrids of *Aquilegia*. „Journ. of Genetics“ 47, p. 87 — 111.
- Skalińska M., 1937. The taxonomical value of two tetraploid groups of *Aquilegia*. „Bibl. Univ. Lib. Pol.“, ser. B, 4, p. 1 — 34.
- Watkins A. E., 1932. Hybrid sterility and incompatibility. „Journ. of Genetics“ 35, p. 125 — 162.
- Winge O., 1917. The chromosomes. Their numbers and general importance, „C. R. Trav. Carlsb.“ 13, p. 137 — 144.

Tablica II.

Fig. 12—15. Mikrofotografia płytek z merystemów korzonków trzech typów chromosomowych (12, 13, 14 — te same co fig. 2, 4, 6). Pow. 2 400 $\times$. Fig. 16. Mikrofotografia fragmentu przekroju korzonka diploidalnego. Pow. ok. 480 $\times$. Fig. 17. Dwie płytki metafazowe powiększone ok. 1 600 $\times$

Plate II

Figs. 12—15. Microphotos of root-tip metaphases of the three chromosomal types of sugar-beets (12, 13, 14 are the same as in fig. 2, 4, 6) $\times$ 2 400. Fig. 16. Part of a section of a diploid root tip (c. 480 $\times$). Fig. 17. Detail of fig. 16, showing two metaphase plates at higher magnification (c. 1 600 $\times$)

Tablica III.

Fig. 18—20. Fotografia kłębków trzech typów chromosomowych pochodzących z diploidów (18), triploidów (19), tetraploidów (20)

Plate III

Fig. 18—20. Photos of fruits of the three chromosomal types; 18 — of diploids, 19 — of the highly sterile triploids, 20 — of tetraploids