Identyfikacja stopnia poliploidalności u buraka (*Beta vulgaris* L.) na podstawie liczby ujść łagiewkowych pyłku

*The identification of polyploidy in beet (*Beta vulgaris* L.)
by determination of pollen pores*

A. KUŹDOWICZ

Morfologiczne badania porównawcze ziarn pyłku haploidalnego i diploidalnego wykazały u całego szeregu roślin zwiększenie liczby ujść łagiewkowych (porusów) w pyłku diploidalnym. Jednym z pierwszych autorów, który zwrócił uwagę na to zjawisko już w 1915 roku, był Gates (cyt. za Winklerem). Stwierdził on mianowicie, że zwykle rasy wiesiołka (*Oenothera*) posiadają pyłek trójkątny z trzema ujściami łagiewkowymi, podczas gdy rasa, która wykazywała pokrój gigantyczny, miała pyłek czworokątny z czterema ujściami łagiewkowymi.

Winkler (1916) badając anatomiczną i histologiczną budowę diploidów i sztucznie wytworzonych tetraploidów u psiankowatych stwierdził, że pyłek diploidalnego *Solanum nigrum* L. jest okrągły i posiada przeważnie trzy porusy, natomiast forma gigas tego gatunku ma przeważnie pyłek o czterech ujściach łagiewkowych. Bardzo rzadko występuje u niej pyłek mający trzy lub pięć ujść łagiewkowych. Tak samo przedstawiają się te stosunki u *Lycopersicum esculentum* Mill. Tutaj również pyłek diploidów jest mniej więcej okrągły i posiada trzy ujścia łagiewkowe, natomiast u tetraploidów jest ich cztery.

Na to, że zjawisko zwiększania liczby ujść łagiewkowych musi mieć związek z zaburzeniami w podziale redukcyjnym, zwrócił uwagę Oehlkers (1927). W wyniku tych zaburzeń nie dochodzi do redukcji chromosomów, dzięki czemu odnośne ziarno pyłku posiada ich podwójną liczbę. Te spostrzeżenia Gatesa, Winklera i Oehlkersa uzupełnione zostały przez Tischlera (1954), który cytuje cały szereg prac wykazujących u różnych gatunków zwiększenie liczby ujść łagiewkowych

przy przejściu ze stanu diploidalnego do tetraploidalnego. U pewnych gatunków zwiększa się nie tylko liczba ujść łagiewkowych, ale także zmienia się kształt pyłku. Ciekawie przedstawiają się np. stosunki ujść łagiewkowych u *Epilobium* i *Crepis*. Hyperhaploidalny pyłek *Epilobium* posiada 4—5 ujść łagiewkowych, a hypohaploidalny tylko dwa. Natomiast skarłowaciały pyłek wykazujący jądra tylko z jednym chromosomem nie miał żadnego ujścia łagiewkowego. W rodzaju *Crepis* u szeregu gatunków stwierdzono zmiany liczby ujść łagiewkowych, natomiast u innych gatunków (np. *Crepis rostrata* i *barbigera*) zmian tych nie obserwuje się. Wyjaśnienia tego zjawiska niestety nie mamy. U tetraploidalnej gruszy pospolitej *Pirus communis* L. pyłek z kształtu jajowatego zmienił się na trójkątny. Również łagiewki pyłkowe diploidalnego pyłku wykazywały często rozgałęzienia, których nie obserwuje się u pyłku haploidalnego.

Obszerniejsze morfologiczne i fizjologiczne badania porównawcze nad pyłkiem diploidalnych i autotetraploidalnych roślin przeprowadził Ch. F u n k e (1956). Obiektami badań tego autora były drobnonasienne gatunki z rodziny motylkowych, a także przedstawiciele innych rodzin (*Brassica*, *Solanum*). Badania te wykazały, że zwiększoną liczbę ujść łagiewkowych mają tylko organizmy poliploidalne (z wyjątkiem traw). Nasuwa się z kolei pytanie, czy istnieje jakiś związek między wielkością pyłku a ilością ujść łagiewkowych. Okazało się, że w obrębie pewnych gatunków rodzaju *Brassica* poliploidy wykazywały typowy czteroporusowy pyłek. Wielkością jednak pyłek ten nie różnił się od pyłku diploidalnych gatunków. Liczba porusów jest więc jednym z objawów stopnia poliploidalności. Jest ona także niezależna od wielkości pyłku. Można to było stwierdzić i u szeregu innych obiektów, których sztuczne poliploidy wykazały tylko niewielkie zwiększenie rozmiarów pyłku. U poliploidów istnieje więc, zdaniem F u n k e g o, wyraźna tendencja do zwiększania liczby ujść łagiewkowych, przy czym rozmiary tego zwiększania są określane przez genotyp. Autor ten stwierdził dalej, że również i warunki wzrostu, a więc środowiska mogą wywierać dość duży wpływ na wytworzenie porusów, jednak zasadniczo na rozmiary tych zmian decydujący wpływ wywiera genotyp.

M a u r i z i o A. (1956) porównując pyłek 12 gatunków roślin diploidalnych i poliploidalnych stwierdził, że tam gdzie haploidalny pyłek posiadał trzy ujścia łagiewkowe, diploidalny wykazał ich cztery, gdy u haploidalnego było 6, diploidalny miał 8. Rozmieszczenie dodatkowych ujść łagiewkowych u pewnych gatunków tetraploidalnych z 3 ujściami łagiewkowymi jest podobne do diploidów z 2 ujściami łagiewkowymi. U innych są one rozmieszczone na powierzchni przypadkowo, dzięki czemu pyłek taki przybiera kształt nieregularny.

W naszym Zakładzie (nie opublikowane) stwierdziliśmy również u tetraploidalnego bobiku (*Vicia faba* L.) zmianę kształtu ziarn pyłku z owalnego na trójkątny, przy czym zmiane uległa również liczba porusów.

Także i pomidory tetraploidalne *Lycopersicum esculentum* Mill. trzech odmian handlowych oraz tetraploidy gatunku dzikiego *Lycopersicum pimpinellifolium* Mill. wykazują cztery porusy, podczas gdy u diploidów jest ich trzy.

Również u seradeli tetraploidalnej *Ornithopus sativus* L. przeważa pyłek cztero- i więcej porusowy, gdy tymczasem diploid ma pyłek 3-porusowy. Natomiast tetraploidalny rajgras angielski *Lolium perenne* L., podobnie jak diploidalny, wykazuje tylko jedno ujście łagiewkowe. To samo stwierdził również F u n k e dla innych traw.

Wybitną zwyzkę porusów wykazuje jednak pyłek sztucznych poliploidów buraka *Beta vulgaris* L. Zagadnienie zwiększania liczby porusów u tego gatunku jest właśnie tematem niniejszej publikacji.

Dzięki stałej tendencji poliploidów do zwiększania liczby porusów w pyłku zaistniała możliwość opracowania metody analiz materiałów poliploidalnych przy pomocy ustalania liczby porusów w pyłku. W związku ze stałą rozbudową prac nad sztucznymi poliploidami zastąpienie na pewnych etapach hodowli analiz cytologicznych (liczenie chromosomów) innymi uproszczonymi, a jednocześnie pewnymi metodami może dać dużą oszczędność czasu i ludzi. Takie proste metody pozwalają również na przeanalizowanie większej ilości materiałów. Mamy już dziś szereg takich metod pomocniczych, które zastępują do pewnego stopnia liczenie chromosomów. Do nich należą pomiary wielkości komórek szparkowych i ziarn pyłku oraz u tych gatunków roślin, które posiadają jądra spoczynkowe z chromocentrami (np. burak), liczenie chromocentrów jąderkowych (trabantowych). Obecnie do tych pomocniczych metod dochodzi nowa metoda, a mianowicie liczenie ujść łagiewkowych pyłku. F u n k e opracował sposób liczenia porusów dla pewnych gatunków z rodziny motylkowych i krzyżowych; w naszym Zakładzie metoda taak została opracowana dla buraków.

MATERIAŁ I METODA

Objektami badań były różne rody tetraploidów i triploidów buraka cukrowego, które wytworzone zostały w naszym Zakładzie. Normalne diploidalne buraki cukrowe pochodziły z nasion handlowych. Zbadany został pyłek różnych typów hodowli buraka cukrowego. Dla lepszego uwidocznienia ujść łagiewkowych pyłku F u n k e (1956) zastosował mieszaninę stężonego kwasu siarkowego i 2—3% błękitu metylenowego w kwasie octowym w stosunku 1 : 2—3. Do kropli tej mieszanki na szkiełku przedmio-

towym sypie się dojrzały pyłek, przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym i preparat jest gotowy do obserwacji.

Stężony kwas siarkowy rozpuszcza kutikulę porusów, a napęczała pod wpływem kwasu octowego plazma ziarna pyłkowego „wyszcza” poprzez porusy w postaci wypustek plazmatycznych. Kombinacje kwasu siarkowego i błękitu metylenowego 1:2 czy 1:3 trzeba wypróbować do poszczególnych gatunków roślin, gdyż zbyt silne stężenia mogą spowodować pękanie pyłku albo wytrysk całej zawartości plazmatycznej przez jeden porus. Mieszaninę tę stosuje się naturalnie tylko do roślin, które nie posiadają wyraźnie zaznaczonych porusów.

Kombinacja kwasu siarkowego z błękitem metylenowym nie dawała dodatnich wyników u gatunków z rodziny krzyżowych. Dlatego też F u n k e poleca badać niedojrzały jeszcze pyłek tych gatunków w acetokarminie. Porusy są wtedy widoczne w postaci wyraźnie zaznaczonych zagłębień w egzynie.

Tam, gdzie porusy są wyraźnie widoczne, można więc prowadzić liczenie w kropli acetokarminu, orceiny czy nigrozyiny. Taki pyłek z wyraźnie zaznaczonymi porusami posiada również burak. Pyłek ten jest kulisty i na jego rzeźbionej powierzchni znajdują się liczne porusy (A r s t s c h w a g e r E., S t a r r e t R. C. 1933).

Ryc. 1. Ziarno pyłku
z wypustkami plazma-
tycznymi

Widoczne są również dobrze ściany ziarna pyłku, wewnętrzna intyna i zewnętrzna egzyna. Ponieważ w pyłku buraka liczba porusów jest duża, dlatego nie można tutaj stosować kwasu siarkowego z błękitem metylenowym, gdyż poszczególne wypustki plazmatyczne zlewają się ze sobą, a poza tym nie ze wszystkich porusów wylewa się zawartość plazmatyczna (ryc. 1). Uwidocznianie porusów za pomocą tej metody nie jest i z tego względu konieczne, gdyż porusy w pyłku buraka są dobrze widoczne nawet bez barwienia. Lepiej jest jednak prowadzić obserwacje pyłku w jakimś barwniku, gdyż wtedy porusy są

wyraźniej widoczne i łatwiej je liczyć. Do barwień stosować można acetokarmin 1%, orceinę 0,5% i 4% nigrozyinę w 45% kwasie octowym. Bardzo dobrze wybarwia pyłek nigrozyina w rozcieńczeniu 1:10, a nawet 1:20 (normalną 4% nigrozyinę w 45% kwasie octowym rozcieńczamy 45% kwasem oct. w podanym wyżej stosunku).

Wykonanie preparatu odbywa się w ten sposób, że do kropli barwnika na szkiełku przedmiotowym wysypujemy pyłek albo kładziemy główkę

pręciową i po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym lekko rozgniatamy. Do badań tych możemy brać pyłek z pylących już kwiatów, jednak aby zapobiec w szkółkach wysadków niepożądanym zapyleniom — badania te trzeba wykonać przed kwitnieniem. Dlatego też materiał pylnikowy bierzemy z najstarszych, jednak jeszcze nie rozwiniętych kwiatów. Przy liczeniu porusów trzeba trzymać się jakiejś zasady. Ponieważ pyłek jest kształtu kulistego, przy obserwacji mikroskopowej widzimy w jednej płaszczyźnie optycznej tylko część tej powierzchni w postaci koła. Obraz tej płaszczyzny otoczony jest dwiema błonami egzyną i intyną. Liczymy tylko te porusy, które znajdują się na tej powierzchni (ryc. 2, 3, 6). Te porusy w obrębie błony wewnętrznej zajmują zawsze określoną powierzchnię i najłatwiej je w ten sposób liczyć. Do celów porównawczych niepożądane jest zresztą zliczanie całkowitej liczby porusów. Przy innej zasadzie liczenia porusów, liczby podane w tabeli 2 mogą odbiegać od podanych w tabeli 1.

Jak przedstawiają się liczby ujęć łagiewkowych w pyłku buraków cukrowych przy różnym stopniu poliploidalności. Przeprowadzone przez nas badania wykazały dla diploidalnych odmian handlowych buraka różnych typów hodowli średnio 7,2 porusów (ryc. 2) z wahaniami od 6,4—8,2 w obrębie intyny.

Ryc. 2. Pyłek diploidów

Nie spotyka się na ogół liczby wyższej od 10. U różnych rodów i linii tetraploidalnych liczba porusów wynosi średnio 15,4 z wahaniami od 13,8—17,5. W pewnych rodach zdarzają się i pojedyncze ziarna pyłku, które mają nawet ponad 20 porusów (ryc. 3). Natomiast u triploidów mamy średnio 11,5 porusów z wahaniami 9,6—16,8. Czy na tej podstawie możemy dokładnie określić roślinę jako di- tri- czy tetraploidalną? Otóż istnieją wyraźne różnice między diploidami i tetraploidami. U diploidów liczba porusów nigdy nie przewyższa 10, a najczęściej powtarzają się

liczby 6, 7, 8. Natomiast u tetraploidów cyfra ta jest zawsze wyższa od dziesięciu. Najczęściej spotyka się cyfry 14, 15, 16. Te dwa typy buraka, a więc diploida i tetraploida, można stosunkowo łatwo odróżnić za po-

Ryc. 3. Pyłek tetraploidów

mocą tej metody. Przytoczone powyżej dla tetraploidów cyfry charakterystyczne są nie tylko dla wczesnych generacji po kolchicynowaniu, ale i spotykamy je w starszych generacjach (C_{8-10}). Tylko w materiale po kolchicynowaniu spotyka się najczęściej pyłek różnokształtny (ryc. 4).

Ryc. 4. Pyłek roślin poddanych działaniu kolchicyny

Na jedną sprawę trzeba tu jeszcze zwrócić uwagę. Tetraploidy w porównaniu z diploidami posiadają również wyraźnie zwiększone rozmiary pyłku. U diploidów średnia wynosi $20,7\mu$, a u tetraploidów $27,3$. Jak wiemy z własnej praktyki, a także z szeregu prac innych autorów (m. in. Feltz 1953, Savicka 1952, Piotrowicz 1955), różnice w rozmiarach ziarn pyłku buraków di- i tetraploidalnych można wykorzystać do identyfikacji tetraploidów w materiale, który poddano działaniu kolchi-

cyny oraz w następnych generacjach po zabiegu. O ile teraz, podczas selekcji morfologicznej pyłku, połączymy mierzenie z liczeniem porusów, wtedy wyniki będą już w stu procentach pewne. Zasadniczo przy przeprowa-

Tabela 1

Liczba porusów i rozmiary ziarn pyłku u buraków di-, tri- i tetraploidalnych

Stopień poliploidalny	Liczba porusów w obrębie intyny średnio	Wahania	Średnica ziarn pyłku	Wahania
Diploid	7,2	6,4 — 8,2	20,7 μ	17,9 — 23,3 μ
Triploid	11,5	9,6 — 16,8	23,0 μ	21,9 — 24,6 μ
Tetraploid	15,4	13,8 — 17,5	27,3 μ	24,7 — 28,4 μ

dzaniu selekcji pyłkowej od razu rzuca się w oczy zwiększona ilość porusów, tak że niekonieczne jest nawet wykonywanie pomiarów średnicy pyłku.

W materiale, który poddany był kolchicynowaniu (Co), a często także w pierwszym pokoleniu po kolchicynowaniu, spotykamy wśród tetraploidów rośliny, które wykazują duży i mały pyłek. Jednak tak w dużych, jak i w mniejszych ziarnach pyłku liczba porusów będzie zawsze wyższa niż u diploidów. Jest to fakt bardzo ważny. Przemawia on za przydatnością tej metody w ustalaniu stopnia poliploidalności tak w materiale poddanym działaniu kolchicyny, jak i w następnych generacjach. Odróżnienie tetraploida od diploida za pomocą tej metody nie przedstawia więc żadnej trudności.

Jak z kolei przedstawia się sprawa identyfikacji triploidów? O ile spojrzymy na tabelkę 1, to różnice w liczbie porusów między di- i triploidami są niewielkie, a więc i odróżnienie tych dwóch typów, jakby się mogło wydawać będzie trudniejsze. W rzeczywistości jednak rozpoznanie triploida nie przedstawia również trudności, gdyż liczba porusów u tych form w porównaniu z diploidami ulega dużym wahaniom. U triploidów zawsze będziemy spotykać pyłek taki, jaki spotykamy u diploidów (7 porusów), i taki, jak wykazują tetraploidy (10 i więcej — porusowy, ryc. 5). To jest zresztą zrozumiałe. Dzięki nierównomiernemu rozdziałowi chromosomów podczas podziału redukcyjnego powstaje taki właśnie różny pyłek u tych typów. Poza tym, jak to stwierdziła również Piotrowicz (1955), pyłek triploidów jest często zdegenerowany. Oprócz ziarn wybarwionych o żywej zawartości plazmatycznej spotyka się liczne ziarna zniekształcone, bezbarwne.

Podany wyżej sposób identyfikacji materiałów poliploidalnych buraków cukrowych oparty na liczeniu ujęć łagiewkowych pozwala więc na łatwą i szybką identyfikację di-, tri- i tetraploidów. Dotąd nie mieliśmy

tak szybkiej i prostej, a jednocześnie tak pewnej metody analizy materiałów poliploidalnych u buraka. Dzięki tej metodzie możemy na każdym etapie hodowli otrzymać w szkółkach czyste i pewne tetraploidy. Nie

Ryc. 5. Pylek triploidowy

rozwiązana została jeszcze sprawa liczby porusów u tych roślin, które samorzutnie powracają w liczbie chromosomów do liczby wyjściowej (Brack-down-Herabregulierung). Zdaje się jednak, że zjawisko to może mieć tylko miejsce w przypadkach, kiedy dany materiał nie był dokładnie zbadywany pod względem czystości, względnie przy omyłkach technicznych.

Ryc. 6. Pylek gatunku *Beta trigyna* (heksaploid)

Nowa metoda selekcji materiałów poliploidalnych buraków pozwala właśnie na wyeliminowanie takich pomyłek.

Na zakończenie trzeba jeszcze dodać, że również u buraków pastewnych wraz ze zwiększeniem się stopnia poliploidalności wzrasta liczba porusów. To samo zaobserwowaliśmy u mieszańców buraka cukrowego

z pastewnym, u których po zdwojeniu liczby chromosomów zwiększyła się od razu liczba porusów.

Ciekawie przedstawiają się również liczby porusów u pewnych gatunków dzikich buraka. Zbadaliśmy naturalnie tylko te, które znajdują się w naszej kolekcji a więc: *B. patula* 2x ma 7—8 porusów, *B. patellaris* 4x — ma pyłek 12—14 porusowy, jednak spotyka się również u niej pyłek o mniejszej liczbie porusów (9—10). Szkoda, że nie można było porównać tego pyłku z pyłkiem form *B. patellaris* 2x. Tej formy nie mamy jednak w naszej kolekcji. Heksaploidalny gatunek *B. trigyna* wykazuje 12—16 porusów w pyłku, a więc tyle co sztuczne tetraploidy.

STRESZCZENIE

Podana została nowa metoda odróżniania form di-, tri- i tetraploidalnych u buraka. Metoda ta oparta jest na liczeniu ujść łagiewkowych (porusów) w ziarnach pyłku. Diploidy wykazują 6—8 porusów na określonej powierzchni pyłku, a liczba ich na ogół nie przekracza 10. Natomiast tetraploidy mają zawsze powyżej 10 porusów — najczęściej 14—16, a niekiedy jest ich nawet powyżej 20. Natomiast triploidy różnią się od jednych i drugich tym, że mają pyłek bardzo zróżnicowany, a więc z taką liczbą porusów jak diploidy, oraz większy tak jak tetraploidy. Te różnice w ilości porusów objawiają się również u poliploidów buraka pastewnego. Wykazują je również gatunki dzikie buraka, które różnią się stopniem poliploidalności.

Zakład Cytologii i Genetyki IHAR
w Bydgoszczy

(Wpłynęło dn. 6.12.1957 r.)

SUMMARY

A new method to determinate the differences in diploid, triploid and tetraploid sugar beets has been established. In this method the pores of pollen grains are to be counted. On a determined surface of the pollen in diploids there are 6—8 pores, and the number of them does not generally exceed ten pores.

The number of pores in tetraploids however, is always higher than ten, generally 14—16 and sometimes more than 20 pores.

In triploids however, the pollen is considerably different. It shows a number of pores similar to diploids and tetraploids.

Such differences occur in polyploids of fodder beets and also in the natural polyploids of the wild species of beets.

LITERATURA

- Artschwager E., Starrett R. R., 1933, The time factor in fertilization and embryo development in the sugar beet, J. Agr. Res. 44: 823—843.
- Feltz H., 1953, Untersuchungen an diploiden und polyploiden Zuckerrüben, Z. f. Pflanz. 32: 275—300.
- Funke Ch., 1956, Vergleichende morphologische Untersuchungen am Pollen diploider und autotetraploider Kulturpflanzen, Z. f. Pflz. 36: 165—196.
- Funke Ch., 1956, Eine Schnellmethode zur Selektion polyploider Pflanzen, Naturwiss. 43: 66.
- Maurizio A., 1956, Pollengestaltung bei einigen polyploiden Kulturpflanzen. Grana palynol. (Stockholm), ref. Züchter 27 (1957) — 254.
- Oehlkers F., 1927, Erblickkeitsforschung an Pflanzen. Wissenschaftliche Forschungsberichte, Naturwiss.-Reihe 18: 179. Th. Seitenkopff, Dresden—Leipzig.
- Piotrowicz M., 1955, Prace wstępne nad produkcją triploidalnych buraków cukrowych, Acta Soc. Bot. Pol. 24: 125—144.
- Savitsky H., 1952, Polyploid Sugar Beets — Cytological Study and Methods of Production, Proc. Amer. Sug. Beet. Techn. 7: 470—476.
- Tischler G., 1954, Handbuch der Pflanzenanatomie, II Allgemeine Pflanzenkariologie, Gebr. Bornträger. 227—228, Berlin.
- Winkler H., 1916, Über experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen, Z. f. Botanik 8: 417—531.