



INSTYTUT
OGRODNICTWA

**Zakład Genetyki, Hodowli i Biotechnologii
Roślin Warzywnych**

**PROCEDURY ROZMNAŻANIA GENERATYWNEGO
W OPARCIU O CECHE MĘSKIEJ STERYLNOŚCI
DLA TWORZENIA NOWEJ ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ
ORAZ PRAKTYCZNEJ HODOWLI MARCHWI, KALAFIORA I POMIDORA**

Autorzy:

dr Piotr Kamiński

dr Marzena Nowakowska

mgr Renata Nowak

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 6.9**

„Ocena wartości użytkowej dwóch systemów męskosterylności cytoplazmatycznej i cytoplazmatyczno-jądrowej roślin kapustowatych, marchwi oraz męskiej sterylności pomidora”

Programu Wieloletniego

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów” finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2014

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Procedura rozmnażania generatywnego linii marchwi w oparciu o cechę męskiej sterility
4. Procedura rozmnażania generatywnego linii kalafiora w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterility
5. Procedura rozmnażania generatywnego linii kalafiora w oparciu o cechę cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterility
6. Procedura rozmnażania generatywnego linii pomidora w oparciu o cechę funkcjonalnej męskiej sterility warunkowanej genem *ms-10*
7. Literatura

1. Wstęp

Dla zachowania postępu biologicznego opracowywane są opłacalne metody krzyżowania komponentów rodzicielskich w obrębie poszczególnych gatunków warzyw. Najczęściej wykorzystywane mechanizmy zabezpieczające przed samozapyleniem związane są z występowaniem cytoplazmatycznej, cytoplazmatyczno-jądrowej lub jądrowej męskiej sterility (marchew, kalafior, kapusta) lub samoniezdgodności (kapusta). U pomidora szczególnym zainteresowaniem, ze względu na stabilność sterility zyskały cechy uwarunkowane genami *ps*, *ps2* (funkcjonalna sterility) i *ms* (sterility sporogoniczna). Dobór odpowiedniego systemu krzyżowania uwzględniający wszystkie uwarunkowania poszczególnych genotypów roślin warzywnych ma szczególnie duże znaczenie dla produkcji nasiennej.

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie skutecznych i opłacalnych metod krzyżowania komponentów rodzicielskich z uwzględnieniem różnych rodzajów męskiej sterility, warunkujących zapylenie krzyżowe dla najważniejszych gospodarczo gatunków warzyw. W ramach zadania są ocenione dwa rodzaje męskiej sterility kalafiora (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.); cytoplazmatyczna warunkowana obecnością sterylizującej cytoplazmy *Raphanus sativus* i cytoplazmatyczno-jądrowa typowa dla genotypów posiadających cytoplazmę z *Brassica nigra*, formy pomidora (*S. lycopersicum*) z cechą męskiej sterility warunkowanej genem *ms - 10* oraz męskosterylne genotypy marchwi (*Daucus carota* L.). W ramach zadania dokonano podsumowania efektów badań nad wykorzystaniem genotypów marchwi, pomidora oraz kalafiora z cechą męskiej sterility do tworzenia nowej zmienności genetycznej. Podsumowanie dotyczy efektów prowadzonej hodowli wsobnej oraz otrzymanych materiałów badawczych w postaci linii wsobnych. Dla każdego typu męskiej sterility opisano procedurę rozmnażania generatywnego z uwzględnieniem zastosowanych metod oraz rezultatów w postaci wydajności tworzenia nasion. Procedury przeznaczone są dla przedsiębiorstw hodowlano-nasiennych, instytucji naukowych oraz innych podmiotów zainteresowanych hodowlą twórczą oraz komercyjną mieszańców F₁ trzech ważnych gospodarczo gatunków warzyw: pomidora, kalafiora oraz marchwi.

3. Procedura rozmnażania generatywnego linii marchwi w oparciu o cechę męskiej sterylności

W produkcji marchwi dominującą rolę odgrywają mieszańce F_1 które przewyższają odmiany ustalone pod względem wysokości i jakości plonu, wyrównania cech morfologicznych korzenia, wysokiej wartości odżywczej oraz zwiększonej odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne. Wykorzystanie linii wsobnych z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności jest skutecznym i efektywnym sposobem umożliwiającym hodowlę heterozyjną.

a) Opis cechy

Cytoplazmatyczna męska sterylność marchwi charakteryzuje się występowaniem zaburzeń w budowie i funkcjonowaniu męskich organów generatywnych w kwiatach, przy jednoczesnym zachowaniu żywotności żeńskich organów generatywnych. Prace nad męską sterylnością marchwi rozpoczęli Welch i Grimboll, którzy w 1947 roku zidentyfikowali i opisali typ brązowych pylników i typ płatkowy. Pierwszy z typów męskiej sterylności cechuje się zasychaniem pylników przed otwarciem kwiatu, natomiast drugi charakteryzuje się przekształceniem pręcików w dodatkowe struktury płatkopodobne. Cecha męskiej sterylności marchwi uwarunkowana jest czynnikiem cytoplazmatycznym i dwoma parami alleli jednym w formie dominującej a drugi w formie recesywnej (*aaBB*). Współdziałanie genów jądrowych i sterylizującej cytoplazmy umożliwia zachowanie męskiej sterylności kwiatów.

b) Hodowla z wykorzystaniem cechy cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS)

Hodowla z wykorzystaniem cechy cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) prowadzona jest przy użyciu męskosterylnych linii matecznych, której rośliny w fazie generatywnej charakteryzują się kwiatami typu płatkowego.

W celu rozmnożenia generatywnego wyselekcjonowanych roślin wyjściowych z cechą CMS i uzyskania w potomstwie roślin w pełni męsko sterylnych, dobiera się płodne linie dopełniające o korzystnych i wartościowych cechach agrobotanicznych. Linie dopełniające przeznaczone do rozmnożenia generatywnego form męskosterylnych powinny posiadać cytoplazmę normalną i dwie pary alleli jeden w formie dominującej drugi w formie recesywnej (*aaBB*). Z tego względu, równoległe z hodowlą linii męskosterylnych, należy prowadzić selekcję odpowiadających im linii męskopłodnych o korzystnych cechach użytkowych. Stabilność cechy męskiej sterylności marchwi jest zależna od warunków środowiska a szczególnie od temperatury. Z tego względu wysokie temperatury w czasie kwitnienia mogą mieć wpływ na ekspresję cechy męskiej sterylności, powodując częściową męską płodność.

Uzyskanie wartościowych, męskosterylnych i dopełniających linii wsobnych marchwi o dobrej zdolności do rozmnażania generatywnego jest warunkiem ich zastosowania w hodowli mieszańcowej.

c) Reprodukacja linii hodowlanych i tworzenie mieszańców F_1 w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterylności

Rozmnożenie generatywne męskosterylnych linii marchwi z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności a także ich form dopełniających oraz wytworzenie próbnych mieszańców F_1 może być prowadzone zarówno w warunkach szklarniowych jak i polowych. W pierwszym etapie należy otrzymać izogeniczne linie męskosterylne i dopełniające parę umożliwiającą zachowanie i rozmnażanie formy męskosterylnej. Drugim etapem hodowli heterozyjnej jest identyfikacja męskopłodnych linii, które charakteryzują się dobrą zdolnością kombinacyjną, wysoką wartością

hodowlaną i do krzyżowań międzyliniowych z linią męskosterylną. Wszystkie komponenty do tworzenia mieszańców F_1 marchwi powinny odznaczać się korzystnymi cechami agrobotanicznymi oraz dobrą zdolnością do rozmnażania generatywnego zarówno przy zapyleniu wsobnym jak i krzyżowym.

c1) Rozmnożenie na skalę eksperymentalną

W celu rozmnożenia generatywnego męskosterylnych i dopełniających linii marchwi w warunkach szklarniowych, optymalnym terminem wysadzania korzeni jest koniec grudnia i początek stycznia. Dzięki temu możliwe jest skrócenie dwuletniego cyklu hodowlanego marchwi do 12-14 miesięcy. Korzenie marchwi powinny być poddane jarowizacji w temperaturze 0-4°C przez okres 8-12 tygodni w warunkach kontrolowanych zapewniających właściwą wilgotność oraz dobre warunki fitosanitarne. Po wyjęciu z chłodni zjarowizowane korzenie powinny zostać poddane starannej ocenie. Do rozmnożenia generatywnego selekcionowane są jedynie rośliny charakteryzujące się całkowitą zdrowotnością, typowe dla danej linii wsobnej oraz o wysokiej wartości użytkowej. Wyselekcjonowane korzenie są sadzone do wysokich doniczek o pojemności przynajmniej 5 l. napełnionych mieszaniną substratu torfowego z piaskiem i umieszczane w szklarni. W początkowym okresie wzrostu roślin optymalna temperatura wynosi około 13°C w nocy i 18-20°C w dzień przy 16-godzinnej długości dnia. Natomiast w okresie formowania pędów nasiennych temperaturę należy podnieść do 21°C w nocy i 27°C w dzień. Terminy zakończenia jarowizacji roślin należy dobierać w ten sposób aby zsynchronizować terminy kwitnienia linii męskosterylnych i linii płodnych, gdyż jej brak ma wpływ na obniżenie wydajności nasion. Początek kwitnienia roślin marchwi w warunkach szklarniowych następuje po 2-3 miesiącach od wysadzenia. W tym czasie należy przeprowadzić pierwszą ocenę poziomu płodności/sterylności krzyżowanych komponentów rodzicielskich. Ze względu na niestabilność cechy męskiej sterylności kontrolę należy przeprowadzać kilkakrotnie w miarę rozwoju kolejnych baldachów na poszczególnych pędach nasiennych. Do krzyżowań międzyliniowych należy wybrać jedynie rośliny odznaczające się całkowitą męską sterylnością form matecznych i męską płodnością linii ojcowskich. Przy selekcji należy również zwrócić uwagę na wybarwienie płatków korony. Rośliny wytwarzające kwiatostany z białymi kwiatami są bardziej atrakcyjne dla owadów zapylających gdyż marchew jest rośliną owadopylną zapylaną przez owady wabione białą barwą płatków i nektarem wydzielanym przez kwiaty. Krzyżowanie roślin marchwi przeprowadza się przy wykorzystaniu niewielkich izolatorów materiałowych o długości 70 cm i około 30 cm średnicy zaopatrzonych w zamek rozpiętych na drucianej konstrukcji. Izolatory umożliwiają zastosowanie owadów zapylających oraz ułatwiają kontrolę sterylności i zdrowotności roślin podczas procesu zapylenia przy zachowaniu izolacji przestrzennej. W celu przekrzyżowania linii męskosterylnych i męskopłodnych, wybrane pędy generatywne obu genotypów umieszcza się razem pod wspólnym izolatorem. Dla uzyskania wysokiej wydajności nasion niezbędnym jest zapewnienie stałej obecności 10-15 owadów muchy domowej (*Musca domestica*) w izolatorze i uzupełnianie liczby brakujących owadów w trakcie kwitnienia roślin. Nawożenie i ochronę przed chorobami i szkodnikami należy prowadzić zgodnie z bieżącymi potrzebami oraz zaleceniami dla marchwi. Nasiona zbierane są osobno z każdej rośliny sukcesywnie w miarę dojrzewania baldachów kolejnych rzędów. Dla zapylenia na skalę eksperymentalną linii marchwi z cechą *cms*

w warunkach szklarniowych, średnia wydajność tworzenia nasion z rośliny przy użyciu muchy domowej wynosi średnio od 1 do 2 gramów (2600 nasion).

c2) rozmnożenie generatywne na skalę komercyjną

Dla uzyskania wyższych wydajności nasion marchwi w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterylności, rozmnożenie generatywne prowadzone jest w warunkach polowych. Nawożenie i ochronę przed chorobami i szkodnikami należy prowadzić zgodnie z bieżącymi potrzebami oraz zaleceniami dla marchwi. Dla zapewnienia izolacji przestrzennej stosuje się izolatory siatkowe o powierzchni 9 lub 18 m² umocowanych na konstrukcji ze stalowych rurek, które zabezpieczają przed przypadkowym zapyleniem. W celu rozmnożenia generatywnego należy wybierać zjarowizowane korzenie odznaczające się całkowitą zdrowotnością, typowe dla danej linii wsobnej oraz o wysokiej wartości użytkowej. Przed posadzeniem do izolatorów korzenie marchwi są zaprawiane przed chorobami bakteryjnymi i grzybowymi. Najbardziej optymalnym terminem wysadzenia na miejsce stałe powinny być pierwsza dekada maja, jednak terminy zakończenia jarowizacji powinny być tak dobierane by zsynchronizować terminy kwitnienia linii męskosterylnych i linii płodnych jako komponentów rodzicielskich. Korzenie marchwi wysadzane są w trzech rzędach co 50 cm a odległość pomiędzy roślinami w rzędzie powinna wynosić 25 cm. W celu zachowania izolacji przestrzennej, rośliny marchwi sadzone są w odległości co najmniej 100 cm od siatki izolatora, tak, by wyrastające pędy kwiatostanowe nie miały z nią styczności. Najwyższą wydajność nasion otrzymuje się przy zastosowaniu 15 roślin /izolator przy proporcji genotypów męskosterylnych do męskopłodnych 4:1. Początek kwitnienia roślin marchwi w warunkach polowych następuje w pierwszej dekadzie lipca. W tym czasie dokonuje się pierwszej oceny poziomu płodności/sterylności krzyżowanych komponentów rodzicielskich usuwając wszystkie rośliny nietypowe dla danej linii oraz odznaczające się brakiem całkowitej sterylności/płodności. Oceny poziomu sterylności form komponentów rodzicielskich, należy przeprowadzić kilkakrotnie począwszy od początku kwitnienia z uwzględnieniem ich sterylności oraz wybarwienia płatków w miarę rozwoju kolejnych baldachów na poszczególnych pędach nasiennych. Do krzyżowań międzyliniowych należy wybrać jedynie rośliny odznaczające się całkowitą męską sterylnością form matecznych i męską płodnością linii ojcowskich. Rośliny wytwarzające kwiatostany z białymi kwiatami są bardziej atrakcyjne dla owadów zapylających. Obecność co najmniej czterdziestu aktywnych owadów zapylających/izolator o powierzchni 9 m² (mucha domowa lub pszczoła samotnicza) zapewnia optymalny poziom zapylenia krzyżowego w trakcie całego okresu kwitnienia. Zbioru nasion należy dokonywać sukcesywnie w miarę dojrzewania baldachów w kolejnych rzędach. Wydajność nasion linii męskosterylnych w izolatorach polowych jest znacznie wyższa niż w izolatorach szklarniowych i wynosi od 6 do 21 gramów/roślinę.

4. Procedura rozmnażania generatywnego linii kalafiora w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterylności

a) Opis cechy

Cecha cytoplazmatycznej męskiej sterylności jest najbardziej efektywnym sposobem umożliwiającym hodowlę heterozyjną kalafiora w oparciu o wykorzystanie linii hodowlanych ze sterylizującą cytoplazmą *Raphanus sativus* jako mechanizmem zabezpieczającym przed samozapyleniem. Męska sterylność, w przeciwieństwie do mechanizmu samoniezgodności,

pozwala na uzyskanie 100% zapylenia krzyżowego pomiędzy komponentami rodzicielskimi, bez względu na warunki środowiska. Cecha cytoplazmatycznej męskiej sterility została opisana w 1968 roku (Ogura) a następnie ulepszona pod względem cech użytkowych i wydajności tworzenia nasion metoda fuzji protoplastów (Pelletier, 1983). W Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach badania nad wykorzystaniem tej cechy prowadzone są od 2000 roku.

Cytoplazmatyczna męska sterility może być wykorzystywana z powodzeniem w programach hodowlanych wszystkich gatunków roślin kapustowatych zarówno na skalę eksperymentalną jak i komercyjną. Mieszance F_1 kalafiora wytwarzane w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterility również charakteryzują się męską sterility, gdyż w dostępnych zasobach genowych dla rodzaju *Brassica* formy przywracające płodność nie są dostępne.

b) Hodowla z wykorzystaniem cechy cytoplazmatycznej męskiej sterility

Hodowla z wykorzystaniem cechy cytoplazmatycznej męskiej sterility jest prowadzona w oparciu o homozygotyczne linie wsobne z cytoplazmą *R. sativus*, której obecność warunkuje występowanie cech anatomiczno-morfologicznych kwiatów z pylnikami nie wytwarzającymi płodnego pyłku. W opisanym typie męskiej sterility budowa kwiatów form męskosterylnych i męskopłodnych jest podobna. Kwiaty i pąki form męskosterylnych charakteryzują się mniejszą wielkością bez widocznych anomaliami w budowie anatomicznej słupków i miodników, co zapewnia dobrą zdolność do wiązania nasion. Dla rozmnożenia genotypów kalafiora z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility wykorzystuje się płodne, izogeniczne linie dopełniające. W celu tworzenia odmian mieszańcowych linie męskosterylne krzyżowane są z płodnymi liniami kalafiora o korzystnych cechach użytkowych i dobrej zdolności kojarzeniowej. Linie męskosterylne z cytoplazmą *R. sativus* charakteryzują się dobrą zdolnością do rozmnażania generatywnego a średnia wydajność nasion wynosi od 40 do 60 gramów/roślinę.

c) Reprodukacja linii hodowlanych i tworzenie mieszańców F_1 w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterility

Dla zapewnienie wysokiej wydajności nasion, pierwsze etapy rozmnożenia generatywnego męskosterylnych linii kalafiora z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility typu *Raphanus sativus* powinny być prowadzone w warunkach szklarniowych z możliwością doświetlania roślin, w temperaturze od 18 do 24°C. Optymalnym terminem wysiewu linii męskosterylnych jest koniec stycznia oraz pierwsza dekada lutego. Ze względu na konieczność synchronizacji terminów kwitnienia oraz różnice w terminach wytwarzania kwiatów, wysiew męskopłodnych form dopełniających powinien następować około 7 dni wcześniej niż linii męskosterylnych. Jednak precyzyjne ustalenie terminu wysiewu płodnych linii ojcowskich i form męskosterylnych powinien być ustalany indywidualnie dla każdej kombinacji. Ze względu na stosunkowo krótki okres intensywnego kwitnienia kalafiora (2 tygodnie), synchronizacja terminów wysiewu zabezpiecza przed częściowym lub całkowitym rozminięciem się terminów kwitnienia komponentów rodzicielskich. Po upływie 3 tygodni, siewki przesadzane są do doniczek o średnicy 12-15 cm i uprawiane w szklarni przy 12 godzinnym doświetlaniu. Nawożenie oraz ochronę przed chorobami i szkodnikami należy prowadzić zgodnie z bieżącymi potrzebami oraz zaleceniami dla kalafiora. W drugiej i trzeciej dekadzie kwietnia, w początkowej fazie wiązania róż, należy przeprowadzić selekcję pod względem cech typowych dla rozmnażanych linii wsobnych oraz pod względem zdrowotności.

c1) Rozmnożenie generatywne oraz tworzenie mieszańców F₁ na skalę eksperymentalną

Rozmnożenie generatywne oraz tworzenie mieszańców F₁ w oparciu o cechę cytoplazmatycznej męskiej sterylności powinno być prowadzone w warunkach szklarniowych przy zastosowaniu zapyleń ręcznych. Linie przeznaczone do rozmnażania generatywnego powinny być wysiane na przełomie stycznia i lutego w ogrzewanej i doświetlanej szklarni. Wytwarzanie pędów generatywnych następuje w pierwszej lub drugiej dekadzie maja w zależności od wczesności rozmnażanych genotypów. W celu zabezpieczenia przed przypadkowym zapyleniem, pędy kwiatostanowe linii męskosterylnych o wielkości powyżej 3 mm są izolowane w fazie pąków kwiatowych, przy pomocy foliowo-pergaminowych torebek. Zapylenia ręczne są wykonywane na świeżo otwartych kwiatach linii męskosterylnych. Każde z wykonanych zapyleń krzyżowych należy precyzyjnie opisać na etykietce przymocowanej poniżej zapyłonego pędu kwiatostanowego z zaznaczeniem danych dotyczących form rodzicielskich, kierunku i typu zapylenia oraz datę krzyżowania. Optymalna temperatura w okresie wiązania nasion linii męskosterylnych wynosi od 18 do 24°C. W temperaturach wyższych od zalecanej następuje obniżenie zdolności do wiązania nasion oraz pogorszenie żywotności pyłku kalafiora linii zapyłających. Średnia wydajność tworzenia nasion/łuszczyne dla linii męskosterylnych typu *R. sativus* jest równie wysoka jak dla linii męskopłodnych i wynosi od 8 do 20 nasion/łuszczyne.

c2) Rozmnożenie generatywne na skalę komercyjną

Rozmnożenie generatywne na skalę komercyjną może być prowadzone w warunkach polowych w izolatorach siatkowych zabezpieczających przed przypadkowym samozapyleniem oraz przy wykorzystaniu owadów zapyłających. Najwyższą efektywność tworzenia nasion w uzyskiwano przy zastosowaniu pszczół samotniczych (*Osmia rufa*). Metoda ta pozwala na uzyskanie wysokiej wydajności tworzenia nasion (40 do 70 gramów/roślinę) przy stosunkowo niskich nakładach pracy. Rośliny przeznaczone do wysadzenia w pole powinny być wcześniej zahartowane w chłodzonej szklarni przez okres 3 tygodni w temperaturze 12-16°C. Wysadzenie roślin na miejsce stałe prowadzone jest w pierwszej dekadzie maja, we wczesnym etapie wiązania róży. Rośliny form męskosterylnych oraz linii płodnych powinny być sadzone w rozstawie 50 x 50 cm w naprzemiennych rzędach. Optymalną proporcją komponentów rodzicielskich dla męskiej sterylności typu *B. nigra* jest 1:1 (formy płodne/formy sterylne). Po posadzeniu rośliny wymagają starannego nawadniania, ochrony przed chorobami bakteryjnymi oraz nawożenia zgodnie z bieżącymi potrzebami i rekomendacjami dla kalafiora. W drugiej dekadzie czerwca, należy przeprowadzić kontrolę poziomu płodności/sterylności oraz selekcję każdej z rozpoczynającej kwitnienie roślin linii męskopłodnych i męskosterylnych. Owady zapyłające należy wprowadzać do izolatorów w których rozwiniętych jest przynajmniej 10% kwiatów kalafiora. Dla optymalnego zapylenia komponentów rodzicielskich zaleca się wykorzystanie 10-15 pszczół samotniczych/roślinę. Dla zapewnienia dobrych warunków rozwoju łuszczyń form męskosterylnych, w drugiej dekadzie lipca, zalecane jest usunięcie z izolatorów roślin męskopłodnych, które były zapyłaczami. Zabieg ten zabezpiecza przed przypadkowym zamieszczeniem nasion linii męskopłodnych i męskosterylnych podczas zbioru oraz stwarza lepsze warunki fitosanitarne dla dojrzewania nasion. Po przekwitnięciu roślin i usunięciu linii męskopłodnych dokonuje się zabiegów ochrony przeciwko chorobom bakteryjnym (*Xanthomonas*, *Erwinia*) i grzybowym (*Alternaria* spp), zgodnie z zaleceniami dla kalafiora. Nasiona kolejnego pokolenia linii wsobnych oraz mieszańców F₁ z cechą cytoplazmatycznej

męskiej sterylności są zbierane wyłącznie z roślin matecznych. Zbiór łuszczyń przeprowadzany jest etapowo, w miarę dojrzewania pędów nasiennych od końca lipca do połowy września, w zależności od warunków pogodowych oraz wczesności rozmnażanych genotypów. Po wysuszeniu łuszczyń, ekstrakcji oraz kalibracji, nasiona form męskosterylnych zachowują średnią żywotność 6-8 lat.

5. Procedura wykorzystania cechy cytoplazmatycznie-jądrowej męskiej sterylności do rozmnażania generatywnego kalafiora.

Procedura przeznaczona jest dla przedsiębiorstw hodowlano-nasiennych, instytucji naukowych oraz innych podmiotów zainteresowanych hodowlą twórczą oraz komercyjną mieszańców F₁ kalafiora.

a) Opis cechy

Cecha cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności jest jednym z mechanizmów zabezpieczających przed samozapyleniem, który umożliwia wykorzystanie linii hodowlanych roślin kapustowatych do tworzenia odmian heterozygicznych. Męska sterylność, w przeciwieństwie do mechanizmu samoniezgodności, pozwala na uzyskanie 100% zapylenia krzyżowego pomiędzy komponentami rodzicielskimi, bez względu na warunki środowiska. Cecha cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności została wprowadzona metodą hybrydyzacji z dzikich form czarnej rzodkwi (*Brassica nigra*) do form użytkowych kalafiora i brokuła (Pearson, 1972), a następnie ulepszona pod względem cech użytkowych i wydajności tworzenia nasion w Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

Cytoplazmatyczno-jądrowa męska sterylność może być wykorzystywana w programach hodowlanych wczesnych i średnio-wczesnych mieszańców F₁ kalafiora oraz w celu rozmnażania generatywnego komponentów rodzicielskich, zarówno na skalę eksperymentalną jak i komercyjną. Mieszańce F₁ kalafiora wytwarzane w oparciu o cechę cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności charakteryzują się męską płodnością.

b) Hodowla z wykorzystaniem cechy cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności jest prowadzona w oparciu o homozygotyczne linie wsobne z cytoplazmą *B. nigra*, której obecność warunkuje występowanie cech anatomiczno-morfologicznych kwiatów typu petaloidowego. W opisanym typie męskiej sterylności zamiast pręcików z prawidłowo wykształconymi pylnikami obecny jest dodatkowy okółek płatków korony. Kwiaty i pąki form męskosterylnych charakteryzują się mniejszą wielkością oraz niekiedy anomaliami w budowie anatomicznej słupków i miodników jednak dwukrotnie większą liczbą kwiatów form męskosterylnych w porównaniu do form męskopłodnych kalafiora zapewnia dobrą zdolność do wiązania nasion. Dla rozmnożenia genotypów kalafiora z cechą cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności wykorzystuje się płodne linie dopełniające, posiadające recesywny gen (*rf,rf*) w formie homozygotycznej odpowiedzialny za utrzymanie cechy CMS. Linie dopełniające charakteryzują się takimi samymi cechami agrobotanicznymi jak linie męskosterylne i stanowią niezbędny element do rozmnażania generatywnego linii męskosterylnych. Współdziałanie recesywnych genów jądrowych ze sterylizującą cytoplazmą *B. nigra* umożliwia zachowanie cechy męskiej sterylności w kolejnych pokoleniach generatywnych. W celu tworzenia odmian mieszańcowych linie męskosterylne krzyżowane są z płodnymi liniami kalafiora o korzystnych cechach

użytkowych i dobrej zdolności kojarzeniowej. Większość uprawnych odmian i linii kalafiora charakteryzuje się posiadaniem dominujących genów *Rf*, *Rf* odpowiedzialnych za przywracanie płodności męskosterylnych linii z cytoplazmą *B. nigra*. Z tego względu, wszystkie mieszańce F_1 uzyskane przy wykorzystaniu cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności są męskopłodne.

Linie męskosterylne z cytoplazmą *B. nigra* przeznaczone do hodowli heterozyjnej powinny odznaczać się dobrą zdolnością do rozmnażania generatywnego przy zapyleniu krzyżowym. W tym celu niezbędnym jest prowadzenie selekcji linii męskosterylnych pod względem wydajności tworzenia nasion przy zapyleniu krzyżowym lub siostrzanym. Linie męskosterylne wytwarzające powyżej 20 gramów nasion/roślinę mogą być wartościowymi komponentami rodzicielskimi do hodowli twórczej.

c) Reprodukacja linii hodowlanych i mieszańców F_1 w oparciu o cechę cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności.

Pierwsze etapy rozmnożenia generatywnego męskosterylnych linii kalafiora z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności z cytoplazmą *Brassica nigra* powinny być prowadzone w warunkach szklarniowych z możliwością doświetlania roślin, w temperaturze od 18 do 24°C. Optymalnym terminem wysiewu linii męskosterylnych jest koniec stycznia oraz pierwsza dekada lutego. Ze względu na konieczność synchronizacji terminów kwitnienia oraz różnice w terminach wytwarzania kwiatów, wysiew męskopłodnych form dopełniających powinien następować 10-7 dni wcześniej niż linii męskosterylnych. Przesunięcie terminu wysiewu płodnych linii ojcowskich do tworzenia mieszańców F_1 powinno być ustalane indywidualnie dla każdej pary komponentów rodzicielskich. Brak synchronizacji terminów wysiewu może spowodować częściowe lub całkowite rozminięcie się terminów kwitnienia co praktycznie uniemożliwi reprodukcję form mieszańcowych z cechą CMS lub wpłynie na obniżenie wydajności nasion. Po upływie 3 tygodni, siewki przesadzane są do doniczek o średnicy 12-15 cm i uprawiane w szklarni przy 12 godzinnym doświetlaniu. Nawożenie oraz ochronę przed chorobami i szkodnikami należy prowadzić zgodnie z bieżącymi potrzebami oraz zaleceniami dla kalafiora. W drugiej i trzeciej dekadzie kwietnia, w początkowej fazie wiązania róż, należy przeprowadzić selekcję pod względem cech typowych dla rozmnażanych linii wsobnych kalafiora oraz pod względem zdrowotności roślin.

c1) Rozmnożenie generatywne na skalę eksperymentalną

Rozmnożenie generatywne na skalę eksperymentalną linii CMS oraz wytworzenie próbnych mieszańców F_1 może być prowadzone w warunkach szklarniowych przy wykorzystaniu zapyleń ręcznych. Pędy generatywne linii kalafiora uprawianych w szklarni są wytwarzane w pierwszej i drugiej dekadzie maja. Pędy kwiatostanowe linii męskosterylnych przeznaczonych do rozmnażania generatywnego w szklarni, w fazie pąków kwiatowych o wielkości powyżej 3 mm, powinny być przykryte przy pomocy papierowo-pergaminowych izolatorów w celu zabezpieczenia przed przypadkowym zapyleniem krzyżowym. Po wytworzeniu pierwszych w pełni rozwiniętych kwiatów należy ocenić ich budowę anatomiczno-morfologiczną dla identyfikacji cech typowych dla cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności. Do rozmnażania generatywnego mogą być przeznaczone jedynie rośliny z kwiatami typu petaloidowego, gdzie pręciki zostały przekształcone w dodatkowe płatki korony. Ręcznych zapyleń dokonuje się na świeżo otwartych kwiatkach linii męskosterylnych. Każda z przeprowadzonych kombinacji powinna być opisana na etykietce przymocowanej poniżej

zapyłonego pędu kwiatostanowego. Opis powinien zawierać wszystkie informacje dotyczące rodzaju form rodzicielskich, kierunku i typu zapylenia oraz datę. Optymalna temperatura dla wiązania nasion linii męskosterylnych wynosi od 18 do 24°C. W temperaturach wyższych od zalecanej następuje obniżenie zdolności do wiązania nasion form matecznych oraz pogorszenie żywotności pyłku kalafiora linii zapyłających. Średnia wydajność tworzenia nasion/łuszczynę dla linii męskosterylnych typu *B. nigra* wynosi od 2 do 8 nasion i ze względu na częste anomalie w budowie łuszczyn jest niższa niż dla linii męskopłodnych.

c2) Rozmnożenie generatywne na skalę komercyjną

Rozmnożenie generatywne na skalę komercyjną może być przeprowadzane w polu przy wykorzystaniu izolatorów siatkowych zabezpieczających przed przypadkowym samozapyleniem przy udziale owadów zapyłających takich jak pszczoła miodna, pszczoła samotnicza, trzmiele lub mucha domowa. Najwyższą efektywność tworzenia nasion w stosunku do poniesionych nakładów uzyskuje się przy wykorzystaniu pszczół samotniczych. Metoda ta pozwala na obniżenie kosztów oraz uzyskanie wysokiej wydajności tworzenia nasion dzięki której z jednej rośliny można uzyskać od 20 do 60 gramów. Rośliny przeznaczone do wysadzenia w pole powinny być wcześniej zahartowane w chłodzonej szklarni przez okres 3 tygodni w temperaturze 12-16°C. Wysadzenie roślin na miejsce stałe zalecane jest w pierwszej dekadzie maja, a optymalna fazą rozwojową roślin kalafiora jest wczesny etap wiązania róży. Rośliny form męskosterylnych oraz linii płodnych należy sadzić w rozstawie 50 x 50 cm w naprzemiennych rzędach. Posadzone na miejsce stałe rośliny wymagają starannego nawadniania, ochrony przed chorobami bakteryjnymi oraz nawożenia zgodnie z potrzebami i rekomendacjami dla kalafiora. Optymalną proporcją komponentów rodzicielskich dla męskiej sterylności typu *B. nigra* jest 1:1 (formy płodne/formy sterylne). Po wytworzeniu pędów kwiatostanowych w drugiej dekadzie czerwca należy przeprowadzić kontrolę poziomu płodności/sterylności oraz selekcji każdej z rozpoczynającej kwitnienie roślin linii męskopłodnych i męskosterylnych. Owady zapyłające wprowadzane są do izolatorów w których rozwiniętych jest przynajmniej 10% kwiatów kalafiora. Dla optymalnego zapylenia komponentów rodzicielskich zaleca się stosowanie 10-15 pszczół samotniczych/roślinę. Dla zapewnienia dobrych warunków rozwoju łuszczyn form męskosterylnych, w drugiej dekadzie lipca, zalecane jest usunięcie z izolatorów roślin męskopłodnych, które były zapyłaczami. Zabieg ten zabezpiecza również przed przypadkowym zamieszczeniem nasion linii męskopłodnych i męskosterylnych podczas zbioru oraz stwarza lepsze warunki fitosanitarne dla dojrzewania nasion. Po przekwitnięciu roślin i usunięciu linii męskopłodnych dokonuje się zabiegów ochrony przeciwko chorobom bakteryjnym (*Xanthomonas*, *Erwinia*) i grzybowym (*Alternaria* spp), zgodnie z zaleceniami dla kalafiora. Nasiona kolejnego pokolenia linii wsobnych oraz mieszańców F₁ z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterylności typu *B. nigra* są zbierane wyłącznie z roślin matecznych. Zbiór łuszczyn przeprowadzany jest etapowo, w miarę dojrzewania pędów nasiennych od końca lipca do połowy września, w zależności od warunków pogodowych oraz wczesności rozmnażanych genotypów. Po wysuszeniu łuszczyn, ekstrakcji oraz kalibracji, nasiona form męskosterylnych zachowują średnią żywotność około sześciu lat.



Fot. 1. Izolatory siatkowe do reprodukcji linii męskosterylnych kalafiora



Fot. 2. Kwiaty typu petaloidowego form męskosterylnych kalafiora, pszczoła samotnicza (*Osmia rufa*) jako zapylacz



Fot. 3. Pędy nasienne form męskopłodnych (od lewej) i męskosterylnych linii kalafiora z cechą cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności

6. Procedura rozmnażania generatywnego linii pomidora w oparciu o cechę funkcjonalnej męskiej sterility warunkowanej genem *ms-10*

a) Opis cechy

Cecha męskiej sterility, uwarunkowana genami *ms* jest jednym z mechanizmów zabezpieczających przed samozapyleniem, który umożliwia wykorzystanie linii hodowlanych roślin pomidora do tworzenia odmian heterozyjnych. Opisano wiele mutantów typu *ms* (*ms - 1 - ms - 46*), cechujących się różnym poziomem sterility będącej efektem deformacji pylników oraz ograniczeniami w wytwarzaniu pyłku, od całkowicie męskosterylnych roślin do form wytwarzających pyłek w pewnych warunkach. Za najlepsze geny męskiej sterility uważane są geny *ms - 10* i *ms - 32* (Michalska A., 1993), które zostały wprowadzone do materiałów hodowlanych i obecnie trwają prace nad ich wykorzystaniem w produkcji nasion odmian heterozyjnych na całym świecie. Należy jednak podkreślić, że mutanty typu *ms*, podobnie jak inne znane typy męskiej sterility u pomidora (*sl*, *ps*, *ps - 2*, *ex*) nie spełniają wszystkich wymagań stawianych idealnym mutantom męskosterylnym (Stevens M.A., Rick C.M., 1986). Wiele ze znanych mutantów *ms* wytwarza bowiem sporadycznie pyłek. Ponadto mutanty te muszą być rozmnażane poprzez krzyżowanie z płodnymi heterozygotami, na skutek czego tylko połowa roślin może być uważana jako forma mateczna. Właściwość ta powoduje konieczność poszukiwania markerów umożliwiających wczesną selekcję roślin męskosterylnych. W opisanym typie męskiej sterility budowa kwiatów form męskosterylnych i męskopłodnych jest podobna. Kwiaty form męskosterylnych charakteryzują się jedynie mniejszą wielkością bez widocznych anomalii w budowie anatomicznej słupków i pylników.

W Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach badania nad wykorzystaniem tej cechy prowadzone są od 2008 roku. W wyniku współpracy z Uniwersytetem w Północnej Karolinie (NCSU), USA, pozyskano nasiona dwóch, segregujących populacji pokolenia F₂ pomidora uprawnego z cechą męskiej sterility uwarunkowanej obecnością genu *ms - 10*. W obrębie segregujących populacji przeprowadzono wstępną selekcję roślin sterility w fazie siewek na podstawie cechy zielonego hypokotylu uwarunkowanej genem *a*, i będącej markerem sterility dla genu *ms - 10*. Wyselekcjonowane genotypy o całkowitej sterility kwiatów przekrzyżowano z płodnymi liniami o zróżnicowanych cechach użytkowych pomidora gruntowego, uzyskując tym samym cenny materiał wyjściowy do dalszych badań. Wynikiem badań prowadzonych na przestrzeni pięciu lat trwania niniejszego programu było wyprowadzenie pięciu męskosterylnych linii (nasiona uzyskane w 2014 roku pokolenie F₇) w oparciu o gen *ms - 10*.

b) Hodowla z wykorzystaniem cechy męskiej sterility uwarunkowana genem *ms - 10*, którego obecność warunkuje występowanie cech anatomiczno-morfologicznych kwiatów z pylnikami nie wytwarzającymi płodnego pyłku. Rozmnożenie genotypów pomidora z cechą męskiej sterility przeprowadza się poprzez krzyżowanie ich z płodnymi heterozygotami, na skutek czego tylko połowa roślin może być uważana jako forma mateczna. Wczesną selekcję roślin męskosterylnych umożliwiają obecność genów modyfikujących wytwarzanie antocyjanu lub blokujących jego syntezę. W przypadku męskiej sterility typu *ms - 10*, markerem jest gen *aa*, warunkujący zielone zabarwienie hypokotylu. W celu tworzenia odmian mieszańcowych wysoce homozygotyczne linie męskosterylne (tylko rośliny beznasienne, czyli zielono-

łodyżkowe) krzyżowane są z płodnymi liniami pomidora o korzystnych cechach użytkowych i wysokiej zdolności kojarzeniowej. Rośliny męskosterylne z genem *ms - 10* charakteryzują się niższą niż dla linii męskopłodnych zdolnością do rozmnażania generatywnego, a średnia wydajność nasion wynosi od 0,10 do 0,28 gramów/owoc. Ponieważ linie męskosterylne wykorzystywane w hodowli heterozyjnej powinny odznaczać się wysoką wydajnością rozmnażania generatywnego przy zapyleniu krzyżowym, dlatego też niezbędne jest prowadzenie selekcji linii męskosterylnych celem poprawy tej cechy. Linie męskosterylne wytwarzające powyżej 0.25 grama nasion/owoc mogą być wartościowymi komponentami rodzicielskimi do hodowli twórczej.

c) Reprodukacja linii hodowlanych i mieszańców F_1 pomidora w oparciu o cechę funkcjonalnej męskiej sterylności.

Rozmnożenie generatywne oraz tworzenie mieszańców F_1 na skalę eksperymentalną i komercyjną w oparciu o cechę męskiej sterylności (*ms - 10*) powinno być prowadzone w warunkach szklarniowych lub pod osłonami przy wykorzystaniu zapyleń ręcznych. Termin wysiewu uzależniony jest od typu uprawy i, w związku z tym może następować od połowy stycznia do połowy czerwca. W fazie siewek (1-2 prawdziwe liście) u każdej linii należy przeprowadzić obserwacje roślin pod względem barwy hypokotyli, segregując je na zielono- (*aa*) i fioletowo łodyżkowe (*a+a+*). Do dalszych prac hodowlanych należy wytypować rośliny z cechą zielonego hypokotyli (*aa*), które ze względu na sprzężenie zaklasyfikowane są jako genotypy z genem *ms-10*. Ponadto dla każdej z tych linii należy wysadzić płodne rośliny z cechą fioletowego hypokotyli (*AA* lub *Aa*), w celu umożliwienia reprodukcji roślin sterylnych z genem *ms-10*. Liczba roślin wysadzonych z obu typów zależy od ich przeznaczenia (rozmnożenie na skalę eksperymentalną lub komercyjną), przy czym liczba płodnych roślin z fioletowym hypokotyliem powinna stanowić 25-35% roślin męskosterylnych. Należy również uwzględnić fakt, iż przy zapyleniu roślin męskosterylnych pyłkiem roślin posiadających oba dominujące allele *A* w formie homozygotycznej wszystkie rośliny populacji potomnej będą męskopłodne. Po posadzeniu rośliny wymagają starannego nawadniania, ochrony przed chorobami bakteryjnymi i grzybowymi oraz nawożenia zgodnie z bieżącymi potrzebami i rekomendacjami dla pomidora. Należy przeprowadzić kontrolę poziomu płodności/sterylności oraz selekcję każdej z rozpoczynającej kwitnienie roślin męskosterylnych. Zapylenia ręczne powinny być wykonywane na świeżo otwartych kwiatach roślin o całkowitej sterylności jako form matecznych. Każde z wykonanych zapyleń krzyżowych lub siostrzanych należy precyzyjnie opisać na etykietce przymocowanej do zapyłonego kwiatostanu z zaznaczeniem informacji dotyczących form rodzicielskich, kierunku i typu zapylenia oraz datę wykonania. Optymalna temperatura w okresie wiązania nasion linii męskosterylnych wynosi od 18 do 24°C. W temperaturach wyższych od zalecanej następuje obniżenie zdolności do wiązania nasion form matecznych oraz pogorszenie żywotności pyłku pochodzącego z roślin zapyłających.

Nasiona kolejnego pokolenia linii wsobnych oraz mieszańców F_1 z cechą funkcjonalnej męskiej sterylności są zbierane wyłącznie z roślin matecznych. Zbiór owoców przeprowadzany jest etapowo, w miarę ich sukcesywnego dojrzewania, w zależności od warunków pogodowych oraz wczesności rozmnażanych genotypów. Po ekstrakcji oraz kalibracji, nasiona form męskosterylnych zachowują średnią żywotność 6 -8 lat.

7. Literatura

- Michalska A. 1993. Hodowla Pomidora i Papryki. W: Hodowla Roślin Warzywnych. Red. K. Niemirowicz-Szczytt, Wydawnictwa SGGW: 132-167
- Ogura H. 1968. Studies on a new male-sterility in Japanese radish with special reference to utilisation of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agr. Kogoshima Univ., 6: 39-78.
- Pearson O.H. 1972. Cytoplasmically inherited male sterility characters and Flavor components from the species cross *Brassica nigra* (L) Koch x *B. oleracea* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97 (3): 397-402
- Peltier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rouselle P., Renard M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. Molecular and General Genetics 191: 244-250.
- Stevens M. A., Rick C. M. 1986. Genetics and Breeding. In: Atherton JG, Rudich J (eds). The Tomato Crops: A Scientific Basis for Improvement. Chapman and Hall, New York, USA: 35-109.
- Welch, J.E. and Grimball, E. 1947. Male sterility in the carrot. Science, 196, 593.