



Ocena morfologiczna, cytologiczna i molekularna międzygatunkowych mieszańców F1 *A. galanthum* x *A. cepa*

Agnieszka Kielkowska, Adela Adamus

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja, Kraków

Morphological, cytological and molecular evaluation of interspecific F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) hybrids

Summary

The interspecific F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) hybrids were obtained via *embryo rescue* technique. For hybrids and parental plants, the morphological traits and pollen fertility evaluation were made. The tested F1 hybrids were similar to the maternal form regarding to the leaves' length, while the number of bulbils leaves and stem diameter were similar to the paternal form. Pollen viability test showed that F1 hybrid plants exhibited complete or partial male sterility. Cytological observations of microsporogenesis and tetrads revealed no disturbances in meiosis; however, the presence of dyads, tryads (22%) and tetrads degeneration (1%) was recorded. The analyses of chloroplast DNA proved that all F1 progenies examined possessed the cytoplasm of *A. galanthum*. We concluded that the sterility or low pollen viability of F1 hybrids is caused by the presence of *galanthum* cytoplasm.

Adres do korespondencji

Agnieszka Kielkowska,
Katedra Genetyki,
Hodowli i Nasiennictwa,
Uniwersytet Rolniczy
im. H. Kołłątaja,
al. 29 Listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
kielkowska@ogr.ar.krakow.pl

Key words:

interspecific hybridization, *Allium*, embryo rescue.

1. Wstęp

Cebula zwyczajna jest gatunkiem o dużym znaczeniu gospodarczym zarówno w Polsce jak i na świecie (1). Ze względu na dużą popularność tego warzywa, oraz zapotrzebowanie na nowe odmiany, hodowcy, w celu zwiększenia zmienności lub

wprowadzenia do form uprawnych nowych cech, wykorzystują krzyżowania oddalone. Dzikie gatunki z rodzaju *Allium* są najczęściej źródłem cech odporności na patogeny, tolerancji na niekorzystne warunki środowiska lub wprowadzenia cechy męskiej sterylności (2).

Obecnie, w produkcji nasion odmian mieszańcowych cebuli, wykorzystuje się cechę cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterylności (CMS). U cebuli znane i używane są dwa typy CMS. Pierwszy typ, zidentyfikowany został w odmianie 'Italian Red', gdzie sterylność warunkowana jest obecnością cytoplazmy typu S oraz dwoma genami jądrowymi ms/ms, a czynnikiem restorerowym jest gen Ms (3). Drugi typ T, opiera się na aktywności locus dominującego A, lub komplementarnych do niego B i C (4). Większość dostępnych na rynku heterozyjnych odmian cebuli była tworzona na podstawie cytoplazmy typu S (5). Stan taki spowodował zawężenie puli genetycznej (jednorodność cytoplazmy) dla form uprawnych tego gatunku, w związku, z czym zaistniała konieczność poszukiwania nowych źródeł tej cechy.

Cenne źródło nowego typu CMS zlokalizowano w dzikim gatunku *A. galanthum*, należącym podobnie jak cebula zwyczajna do sekcji *cepa* (2). Pierwsze próby przeniesienia sterylizującej cytoplazmy *galanthum* do cebuli zwyczajnej opisane zostały w latach 80. ubiegłego wieku (6). W dalszych badaniach w tym zakresie wykazano, że pokolenia krzyżowań wstecznych (BC6, BC7) z introdukcją cytoplazmy *galanthum* posiadają nitki pręcikowe bez pylników (3), co bardzo ułatwia identyfikację roślin męsko-sterylnych. Brak pylników u roślin męsko-sterylnych powoduje że cecha ta nie podlega wpływom środowiska, jak ma to miejsce w przypadku stosowanej w hodowli polskich odmian cytoplazmy typu S.

Celem tego opracowania była ocena morfologiczna mieszańców międzygatunkowych otrzymanych poprzez krzyżowanie *A. galanthum* z polskimi liniami hodowlanymi cebuli zwyczajnej oraz sprawdzenie płodności otrzymanych mieszańców. Wykonano również molekularną ocenę obecności cytoplazmy *galanthum* u roślin mieszańcowych F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*).

2. Materiał i metody

Materiał do oceny morfologicznej jak i cytologicznej stanowiły rośliny mieszańcowe F1 uzyskane za pomocą kultur *in vitro*. Zalążki użyte do zakładania kultur otrzymano po wykonaniu zapylenia formy matecznej *Allium galanthum* pyłkiem formy ojcowskiej *Allium cepa*. Po upływie siedmiu do dziesięciu dni od zapylenia, z kwiatów pobierano powiększone zalążnie, odkazano, a następnie izolowano z nich zalążki. W efekcie zastosowania techniki *embryo-rescue* otrzymano rośliny F1, które następnie aklimatyzowano do warunków *ex vitro*.

W badaniach, jako form ojcowskich, użyto dwóch krajowych linii hodowlanych (AG i DO), ale podczas obliczeń średnich wartości cech, rośliny mieszańcowe F1 potraktowano łącznie.

Mieszańce F1 kwitły w drugim roku wegetacji, podobnie jak rośliny ojcowskie *A. cepa*. Rośliny *A. galanthum*, który jest gatunkiem wieloletnim, nie załamującym szczypioru pod koniec wegetacji, w momencie oceny były w trzecim roku wegetacji.

Ocenę morfologiczną mieszańców F1 oraz roślin rodzicielskich przeprowadzono zgodnie z metodyką Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) (7). Ogółem oceniono 15 mieszańców F1, oraz po 30 roślin *A. galanthum* i *A. cepa*. Wykonano analizę biometryczną roślin w fazie wegetatywnej (liście, łodyga), a po wytworzeniu pędów kwiatostanowych oceniono także ich parametry. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości badanych cech dla każdego z trzech obiektów doświadczenia (mieszańce F1, *A. galanthum*, *A. cepa*). Wyliczono również współczynniki zmienności (V%) badanych cech. Ze względu na nierówną liczebność porównywanych populacji oraz niejednorodnych wariancjach badanych cech, w celu porównania obiektów *Allium cepa* i *Allium galanthum* oraz określenia podobieństwa mieszańców F1 do roślin rodzicielskich zastosowano test *t* Studenta dla różnic między średnimi przy równych i różnych wariancjach (8).

Ocena cytologiczna mieszańców F1 oraz roślin kontrolnych obejmowała analizę żywotności pyłku wg procedury Alexandra (9) oraz ocenę zaburzeń w przebiegu mikrosporogenezy. Żywotność pyłku oceniano na podstawie analizy minimum 500 ziaren dla każdego badanego obiektu. Ocenę zaburzeń przebiegu mejozy i podczas tworzenia tetrad mikrospor wykonano na preparatach rozmazowych. Pąki kwiatowe różnej wielkości (1-5 mm) utrwalano w roztworze Carnoya (3:1- alkohol etylowy : kwas octowy lodowaty) i barwiono karminem octowym. Z każdego obiektu doświadczalnego (*A. galanthum*, *A. cepa* oraz mieszańce F1: *A. galanthum* x *A. cepa* (AG); *A. galanthum* x *A. cepa* (DO)) analizowano około 500 mejozocytów w stadium I i II podziału mejotycznego oraz tetrad mikrospor. Preparaty obserwowano pod mikroskopem świetlnym Nikon Eclipse E600.

Analizę molekularną mieszańców F1 wykonano wykorzystując markery molekularne RFLP (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*), z użyciem techniki PCR. Produkty amplifikacji DNA badanych obiektów uzyskano stosując parę starterów chloroplastowego DNA. Analizie poddano region pomiędzy genem kodującym podjednostkę chloroplastowej karboksylazy rybulozo-1,5-bifosforanu (*rbcl*) a otwartą ramką odczytu 106 (ORF 106). Reakcję PCR przeprowadzono wg metodyki Sulistyaningsih i in. (10). Uzyskane produkty amplifikacji DNA poddano trawieniu wykorzystując enzym restrykcyjny Alu I, a następnie przeprowadzono elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym. W celu wizualizacji, produkty rozdziału wybarwiono bromkiem etydyny (EtBr) i podświetlano promieniami UV.

3. Wyniki

Otrzymane wyniki analizy cech morfologicznych, cytologicznych i molekularnych pozwoliły określić podobieństwo otrzymanych roślin F1 do formy matecznej (*A. galanthum*) lub do formy ojcowskiej (*A. cepa*).

3.1. Ocena morfologiczna mieszańców F1 *A. galanthum* x *A. cepa*

Na podstawie oceny cech w stadium wegetatywnym wykazano, że rośliny mieszańcowe F1 wykształcały jedną lub dwie cebule przybyszowe, podobnie jak forma ojcowska *A. cepa*, która tworzyła tylko jedną cebulę. Wieloletnie rośliny *Allium galanthum* posiadały od dwóch do kilku cebul przybyszowych. Podczas oceny ulistnienia wykazano, że rośliny F1 posiadały podobnie jak forma ojcowska średnio 5 liści na łodydze rzekomej. Natomiast rośliny *A. galanthum* były znacznie słabiej ulistnione i miały przeciętnie od 2 do 3 liści/roślinę (tab. 1). Długość trzech pierwszych liści mieszańców F1 była większa niż u form rodzicielskich, ale ich szerokość była zbliżona do *A. cepa*. Rośliny *A. galanthum* miały znacznie węższe liście (tab. 2). Rośliny F1 charakteryzowały się dłuższą (średnio 19,5 cm) łodygą rzekomą w porównaniu do obu form rodzicielskich. Natomiast pod względem grubości łodygi rzekomej rośliny mieszańcowe F1 były podobne do formy ojcowskiej *A. cepa*. Średnica łodygi rzekomej u *A. galanthum* była mniejsza i nie przekraczała 1 cm (tab. 3).

Tabela 1

Liczba cebul przybyszowych (szt.) oraz liczba liści na łodydze rzekomej (szt.) u mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	Liczba cebul przybyszowych		Liczba liści	
	średnia	V%	średnia	V%
<i>Allium galanthum</i>	2,4 a	58,2	2,4 a	52,9
<i>Allium cepa</i>	1,0 b	0,0	4,8 b	36,7
średnio dla F1	1,3 b	38,1	5,2 b	26,6

Jednakowe litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic między badanymi obiektami przy $p = 0,05$.

Tabela 2

Długość oraz średnica (cm) trzech pierwszych liści u mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	Długość trzech pierwszych liści		Średnica trzech pierwszych liści	
	średnia	V%	średnia	V%
1	2	3	4	5
<i>Allium galanthum</i>	20,2 a	53,0	0,6 a	37,7

1	2	3	4	5
<i>Allium cepa</i>	31,3 a	22,4	1,2 b	17,5
średnio dla F1	45,4 b	19,1	1,0 b	9,4

Jednakowe litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic między badanymi obiektami przy $p = 0,05$.

Tabela 3

Długość oraz średnica (cm) łodygi rzekomej u mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	Długość łodygi rzekomej		Średnica łodygi rzekomej	
	średnia	V%	średnia	V%
<i>Allium galanthum</i>	9,3 a	31,8	0,8 a	76,7
<i>Allium cepa</i>	12,7 a	28,4	1,2 b	22,7
średnio dla F1	19,5 b	27,5	1,3 b	14,7

Jednakowe litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic między badanymi obiektami przy $p = 0,05$.

Na podstawie oceny organów generatywnych wykazano, że rośliny mieszańcowe F1 wykształcały zazwyczaj pojedyncze pędy kwiatostanowe. Natomiast rośliny rodzicielskie *A. galanthum* i *A. cepa* wytwarzały średnio po dwa pędy kwiatostanowe, w nielicznych przypadkach ich liczba była wyższa (5-6 sztuk). Długość pędów kwiatostanowych pokolenia F1 oraz form rodzicielskich nie różniła się od siebie (tab. 4). Wielkość kwiatostanów oceniano w stadium zamkniętym, przed otwarciem osłony pergaminowej. Największe główki kwiatostanowe (wysokość 2,7 cm; średnica 2,8 cm) posiadały rośliny *A. cepa*. Otrzymane mieszańce F1 pod względem tych cech były bardziej zbliżone do roślin matecznych *A. galanthum* i charakteryzowały się mniejszymi główkami kwiatostanowymi (tab. 5).

Tabela 4

Liczba (szt.) oraz długość (cm) pędów kwiatostanowych u mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	Liczba pędów kwiatostanowych		Długość pędów kwiatostanowych	
	średnia	V%	średnia	V%
<i>Allium galanthum</i>	1,8 ab	53,4	54,1 a	19,6
<i>Allium cepa</i>	2,3 a	47,8	46,3 a	45,2
średnio dla F1	1,3 b	37,1	53,8 a	30,9

Jednakowe litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic między badanymi obiektami przy $p = 0,05$.

Tabela 5

Wysokość oraz średnica (cm) główki kwiatostanowej u mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	Wysokość główki kwiatostanowej		Średnica główki kwiatostanowej	
	średnia	V%	średnia	V%
<i>Allium galanthum</i>	1,9 b	30,5	1,9 b	50,0
<i>Allium cepa</i>	2,7 a	28,1	2,8 a	34,5
średnio dla F1	1,4 b	24,0	1,3 b	32,8

Jednakowe litery w kolumnie oznaczają brak istotnych różnic między badanymi obiektami przy $p = 0,05$.

W wyniku oceny zmienności badanych cech morfologicznych (tab. 1-5) zarówno organów wegetatywnych jak i generatywnych roślin F1 oraz *A. cepa* wykazano, że charakteryzowały się one na ogół niską lub średnią zmiennością (V do 50%). Wyraźnie wyższą zmienność ocenianych cech stwierdzono u roślin dzikiego gatunku *A. galanthum*.

3.2. Ocena cytologiczna mieszańców F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Żywotność pyłku roślin kontrolnych *A. galanthum* oraz *A. cepa* była wysoka i wynosiła odpowiednio 83,5 i 89,4% (tab. 6). Natomiast żywotność pyłku mieszańców F1 była bardzo obniżona i wynosiła średnio 14%. Obserwowano zależność żywotności pyłku roślin mieszańcowych od linii ojcowskiej. Wśród dziewięciu mieszańców F1 pochodzących z kombinacji krzyżówkowej *A. galanthum* x linia AG, cztery miały pyłek całkowicie sterylny, a pięć o obniżonej żywotności, nie przekraczającej 46%. Natomiast 6 roślin F1 pochodzących z kombinacji krzyżowań *A. galanthum* x linia DO posiadało pyłek całkowicie sterylny. Oznacza to, że 70% otrzymanych mieszańców F1 nie tworzyło żywotnych ziaren pyłku.

Tabela 6

Żywotność pyłku (%) roślin mieszańcowych F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz form rodzicielskich

Obiekt	(%) roślin z pyłkiem:			Żywotność pyłku	
	0	1-50	70-99	średnia	zakres zmienności
<i>Allium galanthum</i>	0,0	0,0	100,0	83,5	72,0-97,3
<i>Allium cepa</i>	0,0	0,0	100,0	89,4	70,3-99,0
<i>A. galanthum</i> x AG	40,0	60,0	0,0	16,9	0,0-46,0
<i>A. galanthum</i> x DO	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
średnio dla F1	70,0	30,0	0,0	14,1	0,0-46,0

Ze względu na niską żywotność pyłku roślin mieszańcowych F1, przeprowadzono ocenę zaburzeń w przebiegu podziałów mejotycznych i stadium tetrad mikrospor. Nie obserwowano znaczącej liczby zaburzeń w mejozie zarówno u roślin kontrolnych jak i mieszańcowych F1. U *A. galanthum* przebieg podziałów był prawidłowy. U formy ojcowskiej *A. cepa* obserwowano tylko nieliczne chromosomy opóźnione lub wyeliminowane (średnio 0,9% komórek). U mieszańców F1 chromosomy opóźnione i wyeliminowane pojawiały się z częstotliwością 0,1%, a mosty chromatynowe 0,02% (tab. 7).

Tabela 7

Zaburzenia przebiegu mejozy u mieszańców F1 (*A. galanthum* i *A. cepa*) i form rodzicielskich

Obiekt	Liczba badanych komórek	Zaburzenia procesu mejozy (%)	
		chromosomy opóźnione i wyeliminowane	mosty
<i>Allium galanthum</i>	592	0,0	0,0
<i>Allium cepa</i>	430	0,9	0,0
<i>A. galanthum</i> x AG	854	0,2	0,05
<i>A. galanthum</i> x DO	598	0,0	0,0
Średnio dla F1		0,1	0,02

Znacznie więcej nieprawidłowości stwierdzono w trakcie tworzenia się tetrad mikrospor (tab. 8). Obserwowano diady, które nie ulegały kolejnym podziałom, lecz rozpoczynały plazmolizę, prowadzącą w efekcie do ich degeneracji, lub dzieliły się nieprawidłowo wytwarzając triady. Tego typu zaburzeń najwięcej, bo 22%, występowało u roślin mieszańcowych F1. U roślin *A. cepa* zmian takich było tylko 6%. Oprócz degenerujących diad, w badanym materiale obserwowano także degenerujące tetrady, z częstotliwością 1% u mieszańców F1 i 0,2% u *A. cepa*. Natomiast u *A. galanthum*, podobnie jak w mejozie, nie obserwowano także nieprawidłowości na etapie tworzenia tetrad mikrospor.

Tabela 8

Zaburzenia w stadium tetrad mikrospor u mieszańców F1 (*A. galanthum* i *A. cepa*) i form rodzicielskich

Obiekt	Liczba badanych komórek	Zaburzenia w stadium tetrad	
		(%) Degenerujące:	
		diady, triady	tetrady
1	2	3	4
<i>Allium galanthum</i>	400	0,0	0,0
<i>Allium cepa</i>	573	6,3	0,2

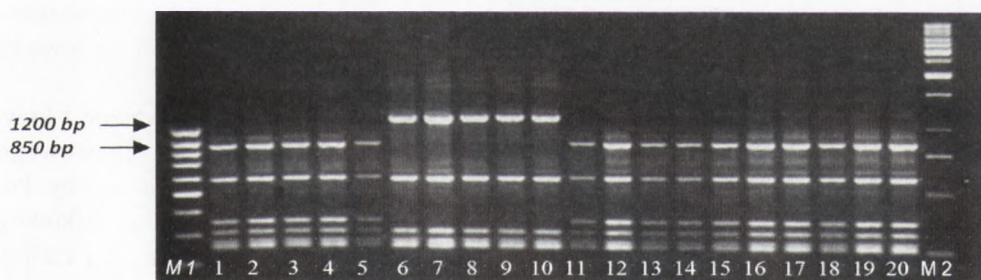
1	2	3	4
<i>A. galanthum</i> x AG	597	42,0	2,2
<i>A. galanthum</i> x DO	257	1,9	0,0
średnio dla F1		21,9	1,1

3.3 Analiza molekularna pokolenia F1

Objęto nią rośliny mieszańcowe F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) oraz rośliny rodzicielskie *A. galanthum* i *A. cepa*. Na podstawie analizy PCR-RFLP chloroplastowego DNA wykazano, że rośliny *A. galanthum* posiadały specyficzny prążek o wielkości 850 bp, podczas gdy forma ojcowska *A. cepa* charakteryzowała się obecnością prążka o wielkości 1200 bp (ryc. 1). Analizując profile restrykcyjne badanych roślin pokolenia F1, u wszystkich stwierdzono obecność fragmentu chloroplastowego DNA o wielkości 850 bp, pochodzącego od formy matecznej.

4. Dyskusja

W przeprowadzonej ocenie cech morfologicznych mieszańców F1 *A. galanthum* x *A. cepa*, wykazano, że pod względem czterech cech (długość liści i łodygi rzekomej oraz długość i szerokość główki kwiatostanowej) przypominały one rośliny mateczne *A. galanthum*. Cechy takie jak: liczba wytwarzanych cebul przybyszowych, liczba liści i ich średnica oraz średnica łodygi rzekomej upodabniały mieszańce F1 do formy ojcowskiej. Natomiast długość łodygi rzekomej rośliny F1 miały znacznie większą, a liczba pędów kwiatostanowych była u nich cechą pośrednią w porównaniu z formami rodzicielskimi. W literaturze ostatnich piętnastu lat brak jest doniesień



Ścieżki 1-5 – *A. galanthum*, 6-10 – *A. cepa*, 11-20 – F1, M1 – 100 bp DNA Ladder, M2 – 1 kb DNA Ladder

Ryc. 1. Profil restrykcyjny trawienia enzymem *Alu* I produktów PCR uzyskanych dla *A. cepa*, *A. galanthum* oraz roślin pokolenia F1 (*A. galanthum* x *A. cepa*) za pomocą pary starterów *rbcl* i *ORF 106*.

na temat oceny morfologii mieszańców międzygatunkowych *A. galanthum* x *A. cepa*. W literaturze donosi się o uzyskaniu mieszańców F1 po krzyżowaniu *A. galanthum* z cebulą zwyczajną (3), oraz w kierunku przeciwnym, tzn. gdy *A. galanthum* użyto jako formy ojcowskiej (6), lecz badania skupiają się na ocenie żywotności pyłku oraz wigoru pojedynczych nasion uzyskanych z krzyżowań. Dostępne są natomiast raporty na temat oceny wielkości i pokroju mieszańców F1 uzyskanych z innych krzyżowań oddalonych w rodzaju *Allium*. Autorzy donoszą, że pod względem pewnych cech rośliny mieszańcowe przypominały formę mateczną lub ojcowską, a niektóre cechy mieszańców przyjmowały wartości pośrednie w porównaniu z gatunkami rodzicielskimi (11,12). Yanagino i wsp. (13) przeprowadzili szczegółową ocenę morfologii mieszańców F1 *A. ampeloprasum* x *A. sativum*. Na podstawie wyników badań wykazano, że pod względem wielkości, pokroju oraz budowy kwiatostanu rośliny mieszańcowe zbliżone były do formy matecznej, natomiast cechy dotyczące cebul były pośrednie między formami rodzicielskimi. Podobne rezultaty otrzymali Oshumi i wsp. (14) u potomstwa z krzyżowania cebuli i czosnku. Wielkość i kształt cebul był zbliżony do formy matecznej, purpurowe zabarwienie nasady pędu mieszańców F1 upodabniały je do czosnku, natomiast parametry liści były pośrednie w stosunku do roślin rodzicielskich.

W przeprowadzonej ocenie żywotności pyłku wykazano, że otrzymane mieszańce miały obniżoną żywotność pyłku, lub były całkowicie sterylne. Podobne wyniki odnotowano w badaniach, gdzie cytoplazmę *galanthum* wprowadzano do cebuli siedmiolatki (*A. fistulosum*) (15,16) lub szalotki (*A. cepa* L. *aggregatum*) (17). Obniżenie żywotności pyłku u roślin mieszańcowych obserwowano również u potomstwa z krzyżowań *A. cepa* i *A. galanthum* (6,18).

W przedstawionej pracy, w mejocytach roślin rodzicielskich *A. galanthum* i *A. cepa* nie odnotowano znaczących zaburzeń podczas podziałów, a obserwowany w stadium tetrad mikrospor niski procent nieprawidłowości znalazł potwierdzenie w wysokiej żywotności pyłku obu form. U roślin mieszańcowych obserwowano niewielki stopień zaburzeń procesu mejozy, ale degenerujące diady i tetrazy mogą być przyczyną obniżonej żywotności pyłku. Całkowita sterylność pyłku obserwowana u 70% mieszańców F1 pozwala przypuszczać, że jej powodem są nieprawidłowości w dalszych etapach formowania ziaren pyłku.

Na podstawie analizy RFLP wykazano, że wszystkie rośliny F1 otrzymane z krzyżowania *A. galanthum* x *A. cepa* posiadały taki sam wzór prążkowy chloroplastowego DNA jak *A. galanthum*, co wskazuje na mateczny typ dziedziczenia cytoplazmy. Ponadto w badaniach tych wskazuje się, że cytoplazma *galanthum* powoduje całkowitą lub częściową męską bezpłodność roślin F1, u których formą ojcowską były rośliny *A. cepa*. Ocena dalszych pokoleń z krzyżowań wstecznych pozwoli ocenić przydatność otrzymanego materiału jako źródła cechy CMS.

Badania częściowo sfinansowane z tematu zleconego przez MRiRW.

Literatura

1. Rumpel J., (2003), Hortpress.
2. Kik C., (2002), *Allium Crop Sci: recent advances*, Eds. Rabinowitch H. D., Currah L., 81-100, CABI Publishing, Oxon UK.
3. Havey M. J., (1999), *J. Amer. Hort. Sci.*, 124, 626-629.
4. Schweisguth B., (1973), *Ann. Melior. Plantes*, 23, 221-223.
5. Havey M. J., (1994), *Allium Improvement Newsl.*, 4, 25-27.
6. McCollum G., (1980), *J. Hered.*, 71, 445-447.
7. COBORU (2001), *Cebula zwyczajna (Allium cepa L.)*.
8. Łomnicki A., (2006), *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*, 108-115, PWN.
9. Dafni A., (1992), *Pollination ecology a practical approach*, Oxford University Press, New York.
10. Sulistyaningsih E., Yanashita K., Tashiro Y., (2002), *Euphytica*, 125, 139-144.
11. Peterka H., Budahn H., Schrader O., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 383-389.
12. Buiteveld J., Suo Y., van Lookeren Campagne M. M., Creemers-Molenaar J., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 765-775.
13. Yanagino T., Sugawara E., Watanabe M., Takahata Y., (2003), *Theor. Appl. Genet.*, 107, 1-5.
14. Oshumi C., Kojima A., Hinata K., Etoh T., Hayashi T., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 969-975.
15. Yamashita K., Arita H., Tashiro Y., (1999), *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 68, 788-797.
16. Yamashita K., Tashiro Y., (2004), *Euphytica*, 136, 327-331.
17. Yamashita K., Tashiro Y., (1999) *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 68, 256-262.
18. van Raamsdonk L. W. D., Ensink W., van Heusden A. W., Vrieling-van Ginkel M., Kik C., (2003), *Theor. Appl. Genet.*, 107, 1048-1058.