



Wczesne stadia embriogenezy po zapyłaniu śliw w warunkach *in vitro*

Ewa Dziejic, Włodzimierz Lech, Monika Małodobry
Katedra Sadownictwa, Akademia Rolnicza, Kraków

Early stages of embryogenesis after fertilization in *in vitro* condition

Summary

Ovules of plum cultivars (Sweet Common Prune, Herman, Gilbert, Sanctus Hubertus, Čačanska Rodna, Čačanska Najbolia) were pollinated with pollen of cv. Stanley on the White medium with addition of 15% sucrose. The nucelluses excised from the fertilized ovules were cultivated on Norstog medium with addition of 3,4% sucrose. The process of fertilization after pollination in the *in vitro* condition was determined on the basis of the paraffin cross-sections: the degeneration of synergid after entering the pollen tube, the fertilization of egg cell were confirmed. The microscopic observations showed the swelling of micropylar part of nucellus. The paraffin cross-sections showed a many-layer kalotka (peculiar morphological structure) and swelled cells of nucellus among which the embryo sac was observed. The presence of embryo without endosperm or the presence of endosperm without embryo in the embryo sac was noted.

Key words:

plum, fertilization *in vitro*, nucellus, embryo.

Adres do korespondencji

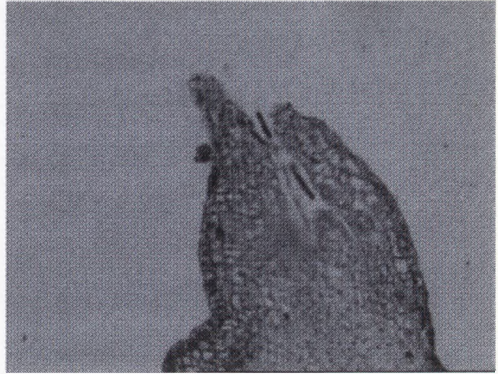
Ewa Dziejic,
Katedra Sadownictwa,
Akademia Rolnicza,
al. 29 listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
ewa@ogr.ar.krakow.pl

1. Wstęp

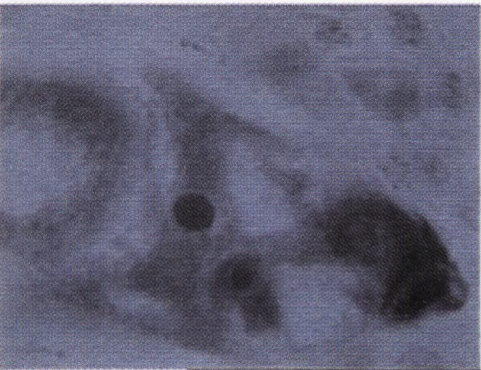
Tradycyjne metody hodowli śliw, polegające na wykonywaniu krzyżowego zapylenia w warunkach polowych, są bardzo uciążliwe ze względu na różne terminy kwitnienia odmian oraz występowanie niezgodności gametofitycznej. Zapłodnienie załączków w warunkach *in vitro* może być alternatywnym sposobem ułatwiającym hodowlę śliw, metoda ta rozszerza również możliwości badawcze z zakresu embriologii roślin.



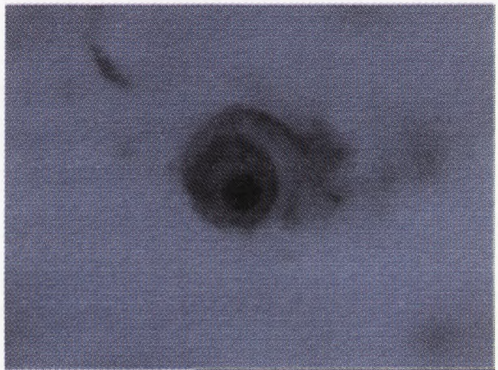
Fot. 1. Chemotropizm łagiewek pyłkowych w pobliżu zalążka pow. $\times 200$.



Fot. 2. Łagiewka pyłkowa w mikropyle zalążka pow. $\times 200$.



Fot. 3. Zanikanie syergidy pow. $\times 600$.



Fot. 4. Połączenie komórki jajowej z komórką plemnikową pow. $\times 600-1000$.



Fot. 5. Prazarodek, brak rozwoju bielma pow. $\times 600-1000$.



Fot. 6. Wielowarstwowa kalotka pow. $\times 200$.



Fot. 7. Mikropylarna część nucellusa pow. $\times 120$.



Fot. 8. Rozwój bielma bez zarodka pow. $\times 600-1000$.

2. Materiał i metody badań

Badaniami objęto uprawne odmiany śliw (Węgierka Zwykła, Herman, Gilbert, Sanctus Hubertus, Čačanska Rodna, Čačanska Najbolja) o korzystnych cechach gospodarczych, wykazujących jednak (zwłaszcza Węgierka Zwykła) objawy wirusowej choroby śliw – szarki. Zapyłanie zalążków wymienionych odmian śliw wykonywano pyłkiem odmiany Stanley. Odmiana ta jest tolerancyjna na wspomnianą chorobę wirusową, co oznacza podatność na wirusa szarki, przy równoczesnym braku objawów na owocach.

Codziennie pobierano z sadu, świeżo rozwinięte kwiaty, z których izolowano zalążnie oraz pylniki. W warunkach sterylnych odkażano materiał roślinny, a następnie wydobywano zalążki oraz pyłek. Zalążki wspomnianych 6 odmian śliw wykładano na pożywkę White'a (1) z dodatkiem 15% sacharozy i zapyłano odkażonym pyłkiem odmiany Stanley. Po upływie 24 godzin od zapylenia wykonywano obserwacje chemotropizmu łagiewek pyłkowych w pobliżu zalążków. Ten etap badań został przedstawiony we wcześniejszym opracowaniu (2). Po upływie 48 godzin od zapylenia zalążków wydobywano z nich nucellusy i przenoszono je na pożywkę wg Norstoga (4) uzupełnioną sacharozą w stężeniu 3,4%. Wydobyte z zalążków nucellusy hodowano przez 20 dni. Obserwacje wykonano przy użyciu mikroskopu odwróconego. Jednocześnie część pobieranych nucellusów utrwalono, w celu wykonania preparatów parafinowych, na podstawie których wykazano przebieg procesu zapłodnienia metodą *in vitro*. Badania takie wykonywano w dwóch sezonach wegetacyjnych 1998 i 2000 r.

3. Wyniki i ich omówienie

Łagiewki pyłkowe rosły na pożywce White'a z 15% roztworem cukru w kierunku zalążków (fot. 1). Szczegółowe badania chemotropizmu łagiewek uwzględniające fazy kwitnienia oraz obecność zalążka lub nucellusa prowadzono przez kilka lat i przedstawiono we wcześniejszym opracowaniu (2). Dowiedziono, że prawie 80% łagiewek pyłkowych znajdujących się w sąsiedztwie zalążka rosło w kierunku mikropyle.

Na podstawie preparatów parafinowych potwierdzono obecność łagiewki pyłkowej w mikropyle zalążka (fot. 2), jak również degenerację jednej z synergid, co świadczy o wnikięciu do niej łagiewki pyłkowej (fot. 3). W wyniku obserwacji woreczka zalążkowego potwierdzono postmitotyczny przebieg zapłodnienia komórki jajowej (fot. 4). W następnym etapie badań hodowane nucellusy poddawano obserwacjom mikroskopowym. W trakcie hodowli stwierdzono zmiany morfologiczne w 21 do 41% nucellusów w pierwszym roku badań, oraz od 4 do 36% w drugim roku badań. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Liczba i procent zapylnych *in vitro* zalążków oraz nucellusów wykazujących zmiany morfologiczne

Odmiana	Początkowa liczba zapylnych zalążków	Procent nucellusów ze zmianami	Początkowa liczba zapylnych zalążków	Procent nucellusów ze zmianami
	1 rok badań		2 rok badań	
Herman	130	30,8	125	4,8
Čačanska Najbolja	–	–	150	31,8
Gilbert	85	41,1	115	18,3
Sanctus Hubertus	110	40,9	125	12,0
Čačanska Rodna	73	38,3	145	27,0
Węgierka Zwykła	199	21,6	50	36,0
Razem	597		710	

Pierwsze zmiany polegające na nieznacznym powiększeniu się mikropylarnej części nucellusa obserwowano po 5 dniach od momentu wydobycia nucellusa z zapłodnionego zalążka (fot. 5). Na bazie preparatów parafinowych wykazano, że powiększającą się część stanowią: wielowarstwowa kalotka (rozbudowana mikropylarna część nucellusa – (3)), oraz powiększone komórki nucellusa w którym pozostaje woreczek zalążkowy (fot. 6). W woreczku zalążkowym obserwowano zarodki bez bielma (fot. 7), lub bielmo bez zarodka (fot. 8). Silnie rozbudowana kalotka, oraz powiększające się komórki ośrodka hamują przepływ składników odżywczych uniemożliwiając prawidłowy rozwój zarodka i bielma.

Otrzymane w doświadczeniu nucellusy pomimo kilkukrotnego pasażowania po 20 dniach zamierały.

Literatura

1. Ranga Swamy N. S., (1961), *Phytomorphology*, 11, 109-127.
2. Dziedzic E., Lech W., Małodobry M., Jankun A., (1998), *Proceedings of the 6th International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology*, Acta Hort., 478, 113-118.
3. Rodkiewicz B., Śnieżko R., Fyk B., Niewęglowska B., Tchórzewska D., (1996), *Embriologia, Angiospermae rozwojowa i eksperymentalna*, Wyd. UMCS, Lublin.
4. Stimart D., Ascher P., (1974), *The Lily Yearbook of the North American Lily Society, Inc.*, 27, 77-84.