



Wpływ egzogennych regulatorów wzrostu na kiełkowanie i konwersję zarodków somatycznych świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.)

Monika J. Latkowska, Klaudia Wojciechowska

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Warszawa

The influence of exogenous growth regulators on germination and conversion in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.)

Summary

Modification of the medium composition was a trial to improve germination and conversion in somatic embryos of Norway spruce. The mature embryos germinated for 1 week in the medium supplemented with either auxin (IAA, IBA, NAA – 0.05; 0.25; 0.1 or 0.5 μM) or gibberellin (GA_3 , GA_{4+7} – 25; 50; 125 or 250 mg dm^{-3}). The hormone-free medium used for the next 2 weeks of germination was enriched or not with activated charcoal (10 mg dm^{-3}).

The auxin applied in the medium did not affect embryo germination nor root and shoot growth. GA_3 stimulated root and shoot growth in germinating somatic embryos, whereas the highest concentration of GA_{4+7} completely inhibited embryo germination.

Key words:

somatic embryogenesis, activated charcoal, auxin, gibberellin, partial drying.

Adres do korespondencji

Monika Joanna Latkowska,
Katedra Roślin
Ozdobnych,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 166,
02-787 Warszawa;
e-mail:
latkowska@alpha.sggw.
waw.pl

1. Wstęp

Somatyczna embriogeneza umożliwia efektywne mikrorozmnażanie wyselekcjonowanych genotypów roślin iglastych odznaczających się dużymi walorami dekoracyjnymi, odpornością na niekorzystne warunki środowiskowe oraz choroby i szkodniki.

Aby jednak metoda ta mogła być wykorzystywana na skalę produkcyjną, konieczne jest jej udoskonalenie. W embriogenezie somatycznej świerka pospolitego należy rozwiązać m.in. takie problemy, jak: brak synchronizacji wzrostu korzeni i pędów podczas kiełkowania zarodków somatycznych, wchodzenie kiełkujących zarodków w stan spoczynku, trudności w aklimatyzacji uzyskanych z zarodków somatycznych roślin w warunkach *ex vitro*, a także ich ograniczona zdolność do przeżycia i dalszego wzrostu po przesadzeniu do gruntu.

Do kiełkowania zarodków somatycznych świerka wykorzystuje się zwykle pożywkę nie zawierającą regulatorów wzrostu (1). Istnieją nieliczne doniesienia na temat zastosowania egzogennych regulatorów wzrostu podczas kiełkowania zarodków somatycznych roślin iglastych. U świerka pospolitego badano wpływ IAA i IBA na kiełkowanie zarodków somatycznych (2), zaś podczas kiełkowania zarodków świerka kłującego stosowano IBA i NAA (3).

W przedstawianych doświadczeniach podjęto próbę zwiększenia efektywności kiełkowania i konwersji zarodków somatycznych świerka pospolitego poprzez modyfikację składu pożywki z wykorzystaniem auksyn i giberelin.

2. Materiały i metody

Dojrzałe zarodki somatyczne genotypu BLG-10 poddano częściowemu dosuszeniu w warunkach wysokiej wilgotności względnej (4), a następnie umieszczono na pożywkę do kiełkowania (5) o pH 5,7, zestalonej 0,35% Phytagelem. Pożywka stosowana przez pierwszy tydzień wzbogacona była w auksynę (IAA, IBA, NAA – 0,05; 0,25; 0,1 lub 0,5 μM) lub giberelinę (GA_3 , GA_{4+7} – 25; 50; 125 lub 250 mg dm^{-3}). Pożywka kontrolna (K) nie zawierała regulatorów wzrostu. W kolejnych dwóch tygodniach kiełkowania stosowano pożywkę bez regulatorów wzrostu, z dodatkiem lub bez węgla aktywnego (AC) (10 g dm^{-3}).

Składniki organiczne, mikroelementy i regulatory wzrostu sterylizowano na zimno, przy użyciu filtrów Sterivex (0,22 μm). Roztwór makroelementów z Phytagelem sterylizowano przez 20 min w autoklawie w temp. 121°C, pod ciśnieniem 0,1 MPa.

W szalce Petriego zawierającej 20 ml pożywki znajdowało się 30 zarodków. W każdej kombinacji badano cztery szalki. Po tygodniu 15 zarodków z każdej szalki wyłożono na pożywkę nie zawierającą regulatorów wzrostu, z dodatkiem węgla aktywnego, a pozostałe 15 – na pożywkę nie zawierającą AC. Po 2 tygodniach kiełkujące zarodki przenoszono na pożywkę bez dodatku węgla. Co trzy tygodnie pasażowano je na świeżą pożywkę.

Przez pierwsze dwa tygodnie kiełkowanie zarodków somatycznych odbywało się w ciemności, później zaś przy świetle białym (Philips TLD Warm White 36W/29), przy długości dnia wynoszącej 18 godzin i gęstości strumienia fotonów 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, w temperaturze $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Po trzech tygodniach kiełkowania oceniono zdolność kiełkowania zarodków somatycznych (za kiełkujące uznawano zarodki o korzeniu długości $> 2 \text{ mm}$ i zieleni

nych liścieniach). Dokonywano też pomiarów korzeni i pędów siewek po 6 tygodniach kiełkowania.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą programu MANOVA z pakietu Statistica z wykorzystaniem 3-czynnikowej analizy wariancji. W przypadku stwierdzenia istotnych różnic między średnimi, przeprowadzono test Duncana. Ocene różnic pomiędzy średnimi dokonano przy poziomie istotności wynoszącym 5%.

3. Wyniki i dyskusja

Auksyny są związkami indukującymi powstawanie korzeni przybyszowych na pędach, dlatego też są często stosowane podczas ukorzenia mikrosadzonek (6,7).

W kulturach embriogenicznych świerka obserwowano korzystny wpływ dojrzewania zarodków somatycznych w obecności IBA na ich późniejsze kiełkowanie i wzrost korzeni (8,9). Zastosowanie w pożywce do kiełkowania $0,25 \mu\text{M}$ IBA działało stymulująco na kiełkowanie zarodków somatycznych świerka pospolitego (2), a $0,5 \mu\text{M}$ NAA w połączeniu z floriglucinolem i arginina stymulowało kiełkowanie i dalszy wzrost korzeni zarodków somatycznych świerka kłującego (3).

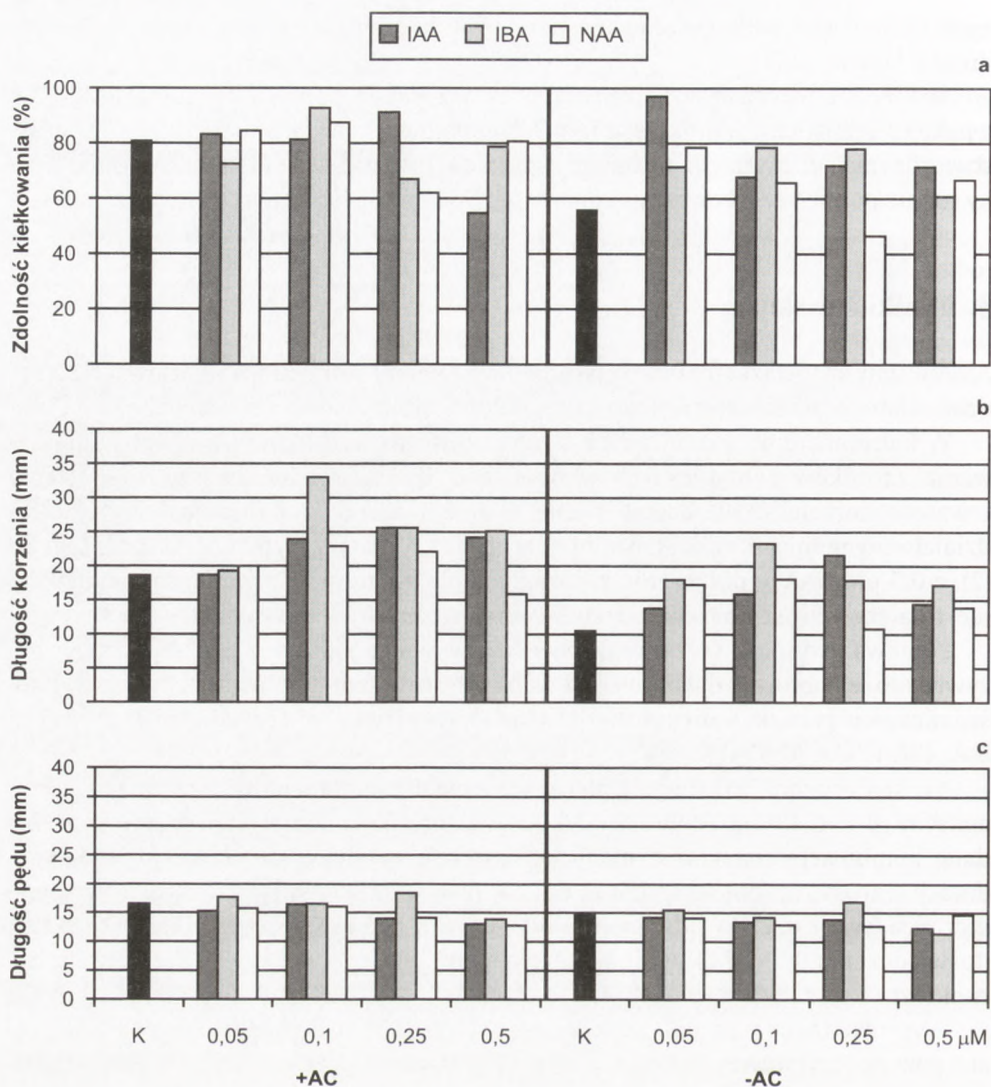
Ponieważ wysokie stężenie auksyny utrzymujące się przez dłuższy czas w pożywce może hamować dalszy wzrost zainicjowanych korzeni, w prezentowanym doświadczeniu zarodki somatyczne poddano przez tydzień działaniu niskich stężeń IAA, IBA i NAA ($0,05$ - $0,5 \mu\text{M}$).

Nie stwierdzono istotnego wpływu stężenia ($P = 0,64$) ani rodzaju zastosowanej auksyny ($P = 0,49$) na zdolność kiełkowania zarodków somatycznych (rys. 1 a). Badane kombinacje auksyn nie miały też istotnego wpływu na oceniany po 6 tygodniach wzrost korzeni ($P = 0,64$) i pędów ($P = 0,42$) kiełkujących zarodków somatycznych (rys. 1 b, c). W odróżnieniu od wyników badań Slaby'ego i Havla (2), w tym doświadczeniu $0,25 \mu\text{M}$ IBA nie wykazało stymulującego wpływu na kiełkowanie zarodków.

Wyprowadzone z zarodków somatycznych młode rośliny iglaste wytwarzają często pąki spoczynkowe, bądź jeszcze *in vitro*, bądź po przeniesieniu do podłoża mineralnego. Aby rośliny mogły rozpocząć wzrost i szybko osiągnęły rozmiary pozwalające na przesadzenie ich do gruntu, konieczne jest przełamanie ich spoczynku (10).

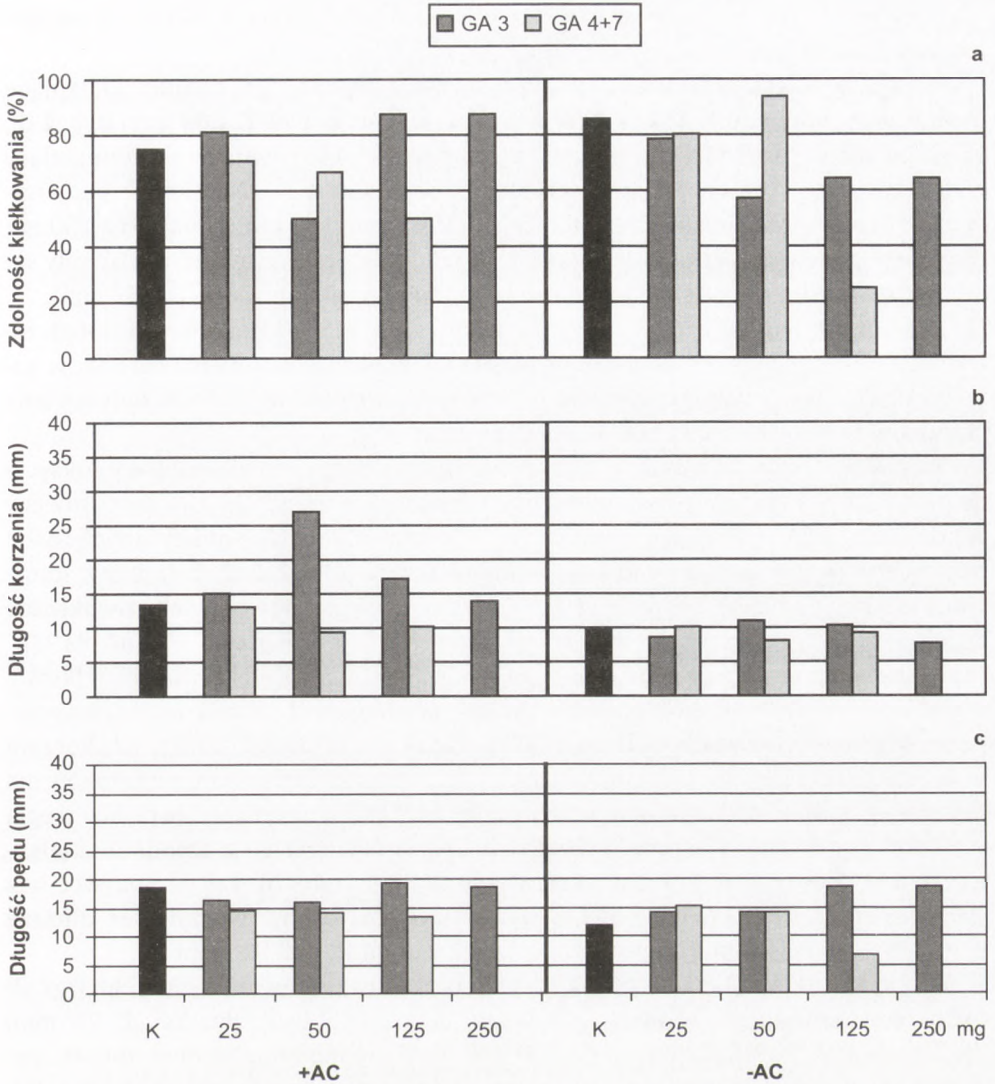
Gibereliny są związkami stymulującymi kiełkowanie nasion, mogącymi też zastępować zabieg stratyfikacji u niektórych gatunków (6). Zastosowana w pożywce giberelina stymulowała kiełkowanie dojrzałych zarodków somatycznych marchwi (11), a także dojrzewanie i konwersję zarodków somatycznych goryczek (12).

W doświadczeniu podjęto próbę wykorzystania giberelin do przerwania spoczynku dojrzałych zarodków somatycznych świerka pospolitego i uzyskanych z nich młodych roślin. Zaobserwowano silny wpływ rodzaju gibereliny na zdolność kiełkowania zarodków somatycznych badanego genotypu ($P = 0,0086$). Dla GA_3 wyniosła



Rys. 1. Wpływ egzogennych auksyn na kiełkowanie (a) oraz dalszy wzrost korzeni (b) i pędów (c) zarodków somatycznych genotypu BLG-10 świerka pospolitego na pożywce z dodatkiem (+ AC) lub bez węgla aktywnego (- AC).

ona średnio 73,12% (grupa jednorodna – b), zaś dla GA_{4+7} – 55,98% (grupa jednorodna – a). W porównaniu z kontrolą GA_3 nie wykazał jednak stymulującego wpływu na kiełkowanie zarodków. Żadna z badanych kombinacji stężeń giberelin i rodzaju pożywki nie stymulowała kiełkowania zarodków somatycznych ($P = 0,87$). Zastosowanie w pożywce 250 mg dm^{-3} GA_{4+7} całkowicie zahamowało kiełkowanie



Rys. 2. Wpływ egzogennych giberelin na kiełkowanie (a) oraz dalszy wzrost korzeni (b) i pędów (c) zarodków somatycznych genotypu BLG-10 świerka pospolitego na pożywce z dodatkiem (+ AC) lub bez węgla aktywnego (- AC).

zarodków badanego genotypu, zarówno po umieszczeniu ich na pożywce z dodatkiem, jak i bez węgla aktywnego (rys. 2 a).

Wpływ badanych giberelin na wzrost korzeni i pędów zarodków różnił się istotnie ($P < 0,005$). Średnia długość korzeni zarodków kiełkujących w obecności GA₃ wyniosła 13,43 mm (b), zaś kiełkujących na pożywce z GA₄₊₇ – 7,76 mm (a). Śred-

nia długość pędów u zarodków kiełkujących w obecności GA_3 wyniosła 16,54 mm (b), zaś u kiełkujących na pożywce z GA_{4+7} – 10,85 mm (a).

Po 6 tygodniach wzrostu najdłuższe korzenie wytworzyły zarodki kiełkujące w obecności $50 \text{ mg dm}^{-3} GA_3$ na pożywce z węglem aktywnym (27,04 mm) (rys. 2 b). W porównaniu z kontrolą (13,44 mm) ta kombinacja wykazywała silnie stymulujący wpływ na wzrost korzeni kiełkujących zarodków ($NIR = 4,31$). Najdłuższe pędy wytworzyły rośliny pochodzące z kombinacji $125 \text{ mg dm}^{-3} GA_3$ (18,6 mm) oraz $250 \text{ mg dm}^{-3} GA_3$ i pożywki z dodatkiem węgla (18,5 mm) (rys. 2 c). Wyniki te nie różniły się jednak istotnie ($P = 0,688$) od uzyskanych dla kombinacji kontrolnej (18,67 mm).

Uzyskanych wyników nie można zweryfikować, ponieważ brakuje, jak dotąd, informacji o wykorzystaniu giberelin na etapie kiełkowania i konwersji zarodków somatycznych roślin iglastych. Związki te były wykorzystywane podczas dojrzewania zarodków *Pseudotsuga menziesii* (13) i *Picea abies* (14).

Węgiel aktywny stosowany jest jako dodatek do pożywek, adsorbujący toksyczne metabolity, a także egzo- i endogenne regulatory wzrostu (15,16). Zastosowany w pożywce z ABA wpływa korzystnie na dojrzewanie zarodków somatycznych roślin iglastych (17). Zaobserwowano też, że umieszczenie dojrzałych zarodków somatycznych *Picea pungens* na pożywce z dodatkiem węgla powodowało dwukrotne zwiększenie ich zdolności kiełkowania i konwersji w porównaniu z kontrolą (3).

W doświadczeniu nad wpływem egzogennych auksyn na efektywność kiełkowania zarodków somatycznych zaobserwowano stymulujące działanie węgla aktywnego na kiełkowanie zarodków ($P < 0,0024$), a także późniejszy wzrost ich korzeni ($P < 0,00001$) i pędów ($P = 0,043$) (rys. 1). Zdolność kiełkowania zarodków na pożywce z dodatkiem węgla wyniosła średnio 78,79% (b), zaś na pożywce bez węgla – 68,09% (a). Średnia długość korzeni roślin wyprowadzonych z zarodków kiełkujących na pożywce z dodatkiem węgla wyniosła 23,47 mm (b), zaś na pożywce bez AC – 16,36 mm (a). W obecności węgla aktywnego rośliny tworzyły też dłuższe pędy (15,44 mm) (b) niż na pożywce bez jego dodatku (13,92 mm) (a).

Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku zastosowania giberelin (rys. 2) – korzenie powstające w obecności węgla aktywnego były dłuższe (13,28 mm) (b) niż wyrastające na pożywce bez dodatku AC (7,91 mm) (a). Średnia długość pędów u zarodków kiełkujących w obecności węgla aktywnego wyniosła 14,91 mm (b), zaś u kiełkujących na pożywce bez AC – 12,48 mm (a).

Wprowadzony do pożywki węgiel aktywny adsorbuje auksyny i cytokininy, nie usuwa z niej natomiast giberelin (18). Można przypuszczać, że korzystny wpływ węgla obserwowany w doświadczeniach z zastosowaniem egzogennych auksyn, wynikał właśnie z adsorbowania nadmiaru tych regulatorów wzrostu z pożywki, co nie miało miejsca w przypadku zastosowania giberelin.

Podsumowując można stwierdzić, że w przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano korzystny wpływ $50 \text{ mg dm}^{-3} GA_3$ na wzrost korzeni kiełkujących zarodków somatycznych badanego genotypu świerka pospolitego. Obecność węgla aktywnego w pożywce do kiełkowania zarodków stymulowała wzrost ich korzeni i pędów.

Literatura

1. Kvaalen H., (1994), *Somatic embryogenesis in Norway spruce [Picea abies (L.) Karst]. Interactions between the gaseous environment and growth regulators*, Doctor Sci. Thesis. Agricultural Univ. of Norway, Ås.
2. Slaby K., Havel L., (1999), *Biologia*, 54, suppl. 7, 15.
3. Afele J. C., Saxena P. K., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ., Netherlands, vol. 3, 99-110.
4. Latkowska M. J., (2002), *Biotechnologia*, 4, 210-226.
5. Krogstrup P., Eriksen E. N., Møller J. D., et al., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 594-597.
6. Davies P. J., (1987), (Ed.), *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, Martinus Nijhoff Publ.
7. Orlikowska T., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, red. Jankiewicz L. S., PWN, Warszawa, 219-249.
8. Roberts D. R., Sutton B. S. C., Flinn B. S., (1990), *Can. J. Bot.*, 68, 1086-1090.
9. Flinn B. S., Roberts D. R., Taylor I. E. P., (1991), *Physiol. Plant.*, 82, 624-632.
10. von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Nørgaard J.V., (1995), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Eds. Jain S., Gupta P., Newton R., Kluwer Ac. Publ., Netherlands, vol. 3, 17-36.
11. Ammirato P. V., (1983), *Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for propagation and breeding*, Eds. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., Macmillan, Inc. New York, vol. 1, 82-123.
12. Mikuła A., (1998), *Embriogeniczny charakter kultur in vitro wybranych gatunków z rodzaju Gentiana*, praca doktorska, OB PAN.
13. Pullman G. S., Gupta P. K., (1994), Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using mixed growth hormones for embryo culture. US Patent no. 5,294,549.
14. Hakman I., von Arnold S., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 149-158.
15. Fridborg G., Eriksson T., (1975), *Physiol. Plant.*, 34, 306-308.
16. Ebert A., Taylor H. F., (1990), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 20, 165-172.
17. Pullman G. S., Gupta P. K., (1991), Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using adsorbent materials in the development stage media. US Patent no. 5,034,326.
18. Eds. Bonga J. M., von Aderkas P., (1992), *In Vitro Culture of Trees*, Kluwer Ac. Publ., Dordrecht.