



Wpływ jakości światła na somatyczną embriogenezę pszenicy

Izabela Menke-Milczarek, Jacek Żebrowski, Janusz Zimny
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

The influence of various light spectra on the efficiency of somatic embryogenesis

Summary

The aim of presented work was to investigate the impact of various light spectra on the efficiency and intensity of wheat somatic embryogenesis. The efficiency of somatic embryogenesis was defined as a percentage of explants forming somatic embryos in reference to all cultured explants. Immature embryos at the spherical coleoptile stage were excised from seeds of a few varieties of wheat and placed onto MS medium (1962) supplemented with 30 μ M Dicamba. The influence of blue, white and red light on the callus growth and induction of somatic embryogenesis was compared. Increase in proportion between the red (600-700 nm) and blue (400-500 nm) component of light spectrum accelerated development of somatic embryos and increased the efficiency of somatic embryogenesis.

Key words:

somatic embryogenesis, light, wheat.

Adres do korespondencji

Izabela Menke-Milczarek,
Zakład Biotechnologii
i Cytologii Roślin,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików, 05-870 Błonie;
e-mail:
i.milczarek@ihar.edu.pl;
j.zebrowski@ihar.edu.pl;
j.zimny@ihar.edu.pl

1. Wstęp

Rozkład spektralny (jakość) światła wpływa na morfogenezę roślin, co jest związane z ich zdolnością adaptacyjną do zmieniających się warunków środowiskowych. Światło wykorzystywane jest jako czynnik fizyczny w prowadzeniu kultur *in vitro* przy dość zróżnicowanych reżimach intensywności i fotoperiodu przez różne laboratoria, co może w części uzasadniać rozbieżności w uzyskiwanych wynikach. Jakość światła nie jest raczej brana pod uwagę przy optymalizacji warunków wzrostu kultur *in*

in vitro. Lazar i wsp. (1) oraz Maddock i wsp. (2) nie zaobserwowali znaczących różnic w regeneracji kalusa w ciemności i na świetle. Stwierdzono natomiast lepszy rozwój pędów z materiału pochodzącego z warunków świetlnych (1). Wczesne badania z lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych nad wpływem barwy światła na wzrost i rozwój kalusa prowadzono głównie na roślinach dwuliściennych, a uzyskane wyniki nie są jednoznaczne (3,4,5). We współczesnych pracach Ekiza i Konzaka (6) wskazuje się, że raczej intensywność światła niż jego jakość wpływa na indukcję i wzrost kalusa w kulturach pylnikowych *Triticum aestivum* L. Istnieją jednak doniesienia na temat stymulującego działania światła o przewodzie barwy czerwonej na somatyczną embriogenezę *Cydonia oblonga* Mill, oraz zwiększenia zdolności do wytwarzania korzeni przez pędy *Pyrus communis* po kulturze *in vitro* (7,8). W literaturze brakuje natomiast danych dotyczących wpływu różnych barw światła na rozwój kalusa uzyskanego z niedojrzałych zarodków roślin zbożowych.

Celem pracy było zbadanie czy stosowanie wybranych zakresów widma światła białego może być bardziej efektywne w indukowaniu somatycznej embriogenezy u pszenicy w porównaniu ze światłem białym.

2. Materiały i metody

Zarodki z dwunastu odmian pszenicy izolowano w stadium koleoptylarnym. Przed wyłożeniem na pożywkę niedojrzałe nasiona sterylizowano przez minutę w 70% alkoholu etylowym, a następnie w 1% podchlorynie sodowym przez 20 minut. Wyizolowane zarodki układano na pożywce MS (9) wzbogaconej 30 μM Dicamby, tarczką skierowaną do góry, a osią zarodka w kierunku pożywki. Zastosowano lampy fluorescencyjne firmy Philips emitujące światło białe (LF 36W), o przewodzie czerwonego (TLD 36W) lub niebieskiego (TLD 36W). Właściwości spektralne światła oraz ilość promieniowania fotosyntetycznie czynnego (PAR) mierzono za pomocą spektrometrii LI1800. Zbliżony poziom intensywności napromieniowania (27-28 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) na wysokości eksplantatów zapewniono dobierając odpowiednią liczbę lamp oraz odległość od źródeł światła. Efektywność somatycznej embriogenezy określano po 21 dniach hodowli jako procent eksplantatów, z których uzyskano rozwijające się somatyczne zarodki. Po 28 dniach oceniano rozwój pędów i intensywność somatycznej embriogenezy. Ocenę wymienionych parametrów dla każdej odmiany dokonywano na 60 kalusach. Intensywność somatycznej embriogenezy oceniano przy użyciu arbitralnej skali, w której słaba intensywność oznaczona była - + (zarodki tworzyły się tylko w jednym punkcie kalusa), ++ - (zarodki rozwijały się w dwóch, przeciwstawnych punktach kalusa), +++ - (zarodki tworzyły się na całej powierzchni kalusa).

3. Wyniki

W przeprowadzonych badaniach wskazuje się, że właściwości spektralne światła modyfikują proces somatycznej embriogenezy u pszenicy. Światło charakteryzujące się dominującym udziałem fotonów w zakresie czerwonym długości fali 600-700 nm, a pozbawione niebieskiego komponentu widma zwiększało efektywność somatycznej embriogenezy w porównaniu ze światłem białym. Z kolei naświetlanie światłem bogatym w długości fali z zakresu niebieskiego (400-500 nm) dawało rezultaty zbliżone do obserwowanych przy świetle białym. Stymulujący wpływ światła czerwonego zaobserwowano u większości z dwunastu testowanych genotypów jednakże stopień ich reakcji był zróżnicowany (tab. 1). Wyraźnie zwiększoną efektywność (o około 50%) dawały w tych warunkach takie odmiany jak: Jawa, Ramiro, Grana, Zyta, Jubilatka, Veery i Torka. Odmiany, które wykazywały wysoką efektywność somatycznej embriogenezy tylko w niewielkim stopniu reagowały na zmiany właściwości spektralnych (CHD 283, Florida). W większości przypadków światło czerwone miało stymulujący wpływ również na wytwarzanie pędów (odmiany Jawa, Ramiro, Zyta, Jubilatka), choć zjawisko to nie było tak wyraźne (tab. 2). Wyjątkowo u odmian Alba i Grana większą liczbę pędów zaobserwowano w świetle białym niż czerwonym. Genotypy o wysokiej zdolności do tworzenia zarodków, dawały także dużą liczbę pędów (CHD 283 i Florida), jednakże liczba wykształczanych pędów w świetle czerwonym i białym była porównywalna. Na podstawie prowadzonych obserwacji wydaje się, że rodzaj światła nie wpływa na intensywność somatycznej embriogenezy (tab. 3).

Tabela 1

Wpływ rodzaju źródła światła na efektywność somatycznej embriogenezy (%)

Genotyp	Rodzaj źródła światła		
	białe	czerwone	niebieskie
Jawa	37	54	33
CHD 283	96	100	97
Florida	98	100	100
Ramiro	33	60	35
Grana	67	82	58
Zyta	15	37	24
Jubilatka	54	76	52
Alba	32	17	37
Elena	10	20	22
Veery S	63	97	60
Nawra	27	48	42
Torka	48	59	45

Tabela 2

Wpływ rodzaju źródła światła na liczbę pędów (%) powstających z kalusa

Genotyp	Rodzaj źródła światła		
	białe	czerwone	niebieskie
Jawa	33	57	30
CHD 283	93	97	97
Florida	100	100	83
Ramiro	28	48	40
Grana	55	45	33
Zyta	8	30	10
Jubilatka	60	75	50
Alba	17	5	8
Elena	5	12	7

Tabela 3

Wpływ rodzaju źródła światła na intensywność somatycznej embriogenezy

Genotyp	Rodzaj źródła światła		
	białe	czerwone	niebieskie
Jawa	+	++	+
CHD 283	++	+++	+++
Florida	+++	+++	+++
Ramiro	+	+	++
Grana	+	++	++
Zyta	+	++	++
Jubilatka	++	++	++
Alba	++	+	++
Elena	++	+	+

+ - słaba, ++ - dobra, +++ - bardzo dobra intensywność somatycznej embriogenezy

4. Dyskusja

Na podstawie uzyskanych w naszej pracy wyników wskazuje się, że zawężenie zakresu widma światła do barwy czerwonej, przy utrzymaniu tego samego poziomu PAR działa stymulująco na somatyczną embriogenezę u pszenicy. Zastosowanie światła niebieskiego tylko nieznacznie modyfikuje przebieg tego procesu. Sugeruje to, że proces somatycznej embriogenezy jest kontrolowany przez receptory światła, podobnie jak wzrost i rozwój roślin *in vivo*. W prowadzonych dotychczas badaniach nad wpływem światła o różnej długości fali na rozwój kultur różnych gatunków roślin otrzymane wyniki są często ze sobą sprzeczne. Butenko i wsp. (10) wykazali, że światło o przewodze barwy czerwonej posiada właściwości stymulujące wzrost kalusa marchwi, podczas gdy Polevaja (4) obserwowała hamujący wpływ tego samego rodzaju oświetlenia. Z kolei Halperin (5) stwierdził, że jakość światła nie ma żadnego wpływu na somatyczną embriogenezę. Według Michlera i Linebergera (11) efekty

działania światła na tworzenie się zarodków somatycznych, biorąc pod uwagę jego cechy jakościowe i ilościowe, są zależne od gatunku rośliny. Nasze obserwacje są zgodne z uzyskanymi przez Michlera i Linebergera (11), którzy wykazali wyższą efektywność indukowania zarodków z zawiesiny komórkowej marchwi światłem czerwonym. Autorzy ci stwierdzili ponadto występowanie pewnych aberracji morfologicznych tworzących się zarodków jakie towarzyszyły tej reakcji. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy żadnych zmian dotyczących przebiegu rozwoju somatycznych zarodków indukowanych w świetle czerwonym lub białym, które byłyby związane ze zmianami morfologicznymi. Onofrio i wsp. (7) również nie wykazali różnic w morfologii pomiędzy somatycznymi zarodkami *Cydonia oblonga* Mill, w wyniku traktowania kultur różnymi długościami fal. Na podstawie przeprowadzonych przez nas eksperymentów wynika, że światło czerwone przyspieszało tempo rozwoju somatycznych zarodków pomiędzy 14 i 21 dniem, w porównaniu do światła białego. Podobnych obserwacji dokonali Michler i Linenberger (11) w zawiesinie komórkowej *Daucus carota*.

Uzyskane przez nas wyniki pozwalają traktować spektrum światła jako jeden z czynników, który może być wykorzystany do optymalizacji procesu somatycznej embriogenezy u roślin zbożowych.

Literatura

1. Lazar M. D., Collins G. B., Vian W. E., (1983), J. Heredity, 74, 353-357.
2. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J., (1983), J. Exp. Bot., 34, 915-926.
3. Seibert M., Wetherbee P. J., Job D. D., (1975), Plant Physiol., 56, 130-139.
4. Polevaya V. S., (1967), Fiziol. Rast., 14, 48-56.
5. Halperin W., (1970), in: *Control mechanisms in the expression of cellular phenotypes*, Ed. Padykula H. A., Symp. Int. Soc. Cell Biol, Acad. Press, New York, 169-191.
6. Ekiz H., Konzak C. F., (1997), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 50, 7-12.
7. Onofrio C. D., Morini S., Bellocchi G., (1998), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 53, 91-98.
8. Bertazza G., Baraldi R., Predieri S., (1995), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 41, 139-143.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), Physiol. Plant., 15, 473-497.
10. Butenko R. G., Yakovleva Z. M., Dimitrieva N. N., (1961), Dokl. Akad. Nauk SSSR, 139, 1246-1249. (English trans. (1962), Dokl. Akad. Nauk SSSR Bot. Sci. Sect., 139, 147-150).
11. Michler C. H., Lineberger D., (1987), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 11, 189-207.