



## Możliwości wykorzystania różnych fragmentów zarodka kukurydzy (*Zea mays* L.) w hodowli *in vitro*

Magdalena Szechyńska, Maria Filek

Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, Polska Akademia Nauk, Kraków

### Possibility of the application of various fragments of maize (*Zea mays* L.) embryos in cultures *in vitro*

#### Summary

The aim of the performed investigations was to determine which part of the embryo has the optimal properties for callus induction at low concentrations of 2,4-D ( $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

The explants were cut along or across the embryo axis into 2, 3, 4 fragments and cultured on the Murashige and Skoog medium for 6 weeks. It was found that callus derived from mature embryos (dry seeds) is characterised by comparable fresh and dry mass and by similar changes in size of the cells with fragments derived from mature embryos (but before the dormant) and from immature embryos. Essential difference was observed in the germination ability of the explants. The percentage of germination of mature embryo fragments was the lowest. It was demonstrated that despite of the embryo type, fragments originating from its central part appeared the most suitable for *in vitro* culture. In the case of these fragments the highest increase of the fresh mass of callus tissue, optimal morphological features and the appearance of meristematic centres were observed.

#### Key words:

*Zea mays* L., callus culture, embryos, 2,4-D.

#### Adres do korespondencji

Magdalena Szechyńska,  
Zakład Fizjologii Roślin  
im. F. Górskiego,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Podłużna 3,  
30-239 Kraków.

### 1. Wstęp

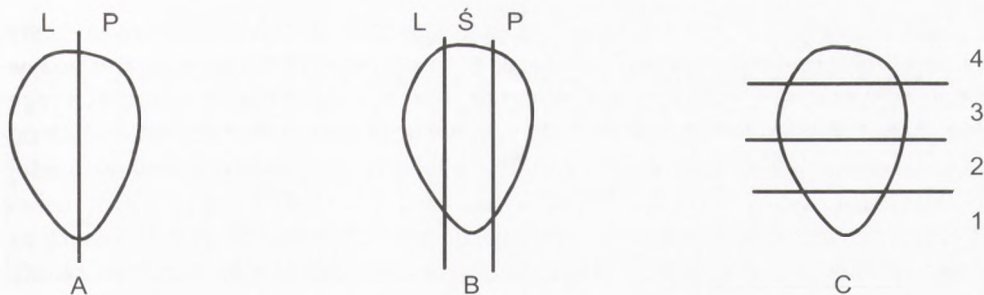
Uzyskanie zdolności do tworzenia tkanki kalusowej, w warunkach hodowli *in vitro* może nastąpić zarówno w dojrzałych jak i niedojrzałych zarodkach kukurydzy. W celu zwiększenia

wydajności tego procesu stosuje się technikę cięcia zarodków, oraz układanie ich na pożywce w pozycji tarczką w górę. Zabiegi te ograniczają konkurencyjny proces kiełkowania. Cięcie zwiększa powierzchnię zranienia, a wyłożenie zarodka tarczką w górę zapewnia lepszy kontakt epiblastu z pożywką indukującą kalusowanie (1). Dla kukurydzy cięcie, odpowiednie zorientowanie na pożywce i standardowo stosowane stężenia 2, 4-D ( $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) są niewystarczające. Zarodki, zarówno dojrzałe jak i niedojrzałe charakteryzują się większą siłą regeneracji pędów i korzeni, niż tworzeniem kalusa. Przyczyną jest najprawdopodobniej bardzo wysoka zawartość endogennej zeatyny (2). Odcięcie stożka wzrostu stosowane z powodzeniem dla pszenicy, czy bobiku, jest zaledwie w 15% skuteczne dla kukurydzy. Kiełkujące fragmenty utrudniają hodowlę i zwiększają nakład pracy. Podwyższenie stężenia 2,4-D w pożywce do  $8\text{--}10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  hamuje kiełkowanie, zwiększa przyrost kalusa, jednak bardzo niekorzystnie wpływa na przyszłą regenerację (dane własne, nie publikowane), a po przekroczeniu pewnego krytycznego poziomu 2,4-D stymuluje indukcję i wzrost korzeni. Proces ten jest zjawiskiem bardzo niepożądanym w hodowli *in vitro*, gdy jest to jedyna droga regeneracji.

Celem eksperymentu było określenie, które części zarodka posiadają optymalne cechy dla indukcji kalusa przy niskich stężeniach 2,4-D ( $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) w pożywce, a które są odpowiedzialne za intensywny proces kiełkowania.

## 2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły: dojrzałe zarodki kukurydzy (DZ – 5 mm) odmiany Gama, pobierane z nasion przed wejściem ich w okres spoczynku, dojrzałe zarodki pochodzące z suchych nasion form S245 x Co255, K103 x K85, KOC 9431, oraz niedojrzałe, około 2 mm zarodki form K103 x K85, KOC 9431. Po dezynfekcji (3 min 70% etanol, 15 min 10% Domestos) i trzykrotnym płukaniu wodą sterylną izolowano zarodki z ziarniaków i cięto na 2, 3 i 4 części (rys. 1): jednokrotnie, wzdłuż głównej osi (A), dwukrotnie, równoległe do głównej osi (B) lub trzykrotnie, prostopadle do osi zarodka (C). Odpowiednie części zarodka wykładano na osobne płytki Petriego z pożywką wg Murashige i Skooga (3) z dodatkiem  $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  sacharozy, 2,4-D ( $05 \text{ i } 2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i zestaloną agarogel (4  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Fragmenty hodowano w  $26^\circ\text{C}$  i przy napromieniowaniu ok.  $20 \text{ W} \cdot \text{m}^2$ . Po czterech dniach zliczono fragmenty zarodków ze zregenerowanymi pędami, korzeniami, pędami i korzeniami oraz fragmenty tworzące kalus. Wyniki przedstawiono w procentach sumarycznej liczby zarodków. Następnie przeprowadzono selekcję, odcinając pędy i korzenie. Zaindukowano w ten sposób tworzenie większej masy kalusa. Jego świeżą masę wyznaczono po 2, 4 i 6 tygodniach hodowli. Suchą masę i morfologię komórek badano po 6 tygodniu hodowli. Pomiary wielkości komórek dokonywano za pomocą mikroskopu odwróconego typu Olympus i komputerowej analizy obrazu Lucia G 3.52 a.



Rys. 1. Schemat cięcia zarodków kukurydzy, przed wyłożeniem na pożywkę.

### 3. Wyniki i dyskusja

Wstępny eksperyment przeprowadzono na odmianie kukurydzy cukrowej Gama. Do doświadczeń wybrano zarodki dojrzałe, zebrane bezpośrednio z roślin, przed wejściem w fazę spoczynkową. Potraktowano je jako formę przejściową pomiędzy zarodkami niedojrzalymi (ok. 2-3 mm), a dojrzałymi pochodzącymi z suchych nasion. Zarodki cięto na 4 części prostopadle do osi zarodka (rys. 1C). Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono dominację kiełkowania nad indukcją kalusa, nawet gdy wykładano bardzo małe fragmenty zarodków (tab. 1). Zauważono, że im mniejsza i bardziej peryferycznie położona część zarodka tym mniejsze było prawdopodobieństwo otrzymania normalnych pędów. Skręcone i taśmowate pędy nie rosły i nie gwarantowały otrzymania normalnych roślin. Fragment z którego uzyskano największą świeżą masę kalusa był oznaczony umownie cyfrą 2 (rys. 1C).

Tabela 1

Kiełkowanie fragmentów zarodków odmiany Gama po wyłożeniu na pożywkę oraz dalszy wzrost kalusa

Fragment	4 dni (% zarodków):				Tygodnie		
	korzeń i pęd	korzeń	pęd	kalus	2	4	6
					świeża masa kalusa [mg]*		
0,5 mg 2,4 – D w 1 dm <sup>3</sup> pożywki							
1	0	36	0	64	56 b	73 cd	76 cd
2	12,5	12	56	32	115 a	148 bc	150 b
3	13	4	56	33	56 b	94 c	94 c
4	0	13	0	10	19 c	21 d	21 d
2 mg 2,4 – D w 1 dm <sup>3</sup> pożywki							
1	0	18	4	84	63 b	103 c	103 c
2	0	12,5	46	29	111 a	225 a	249 a
3	0	0	73	27	92 a	156 b	159 b
4	0	0	0	15	25 c	29 d	36 d

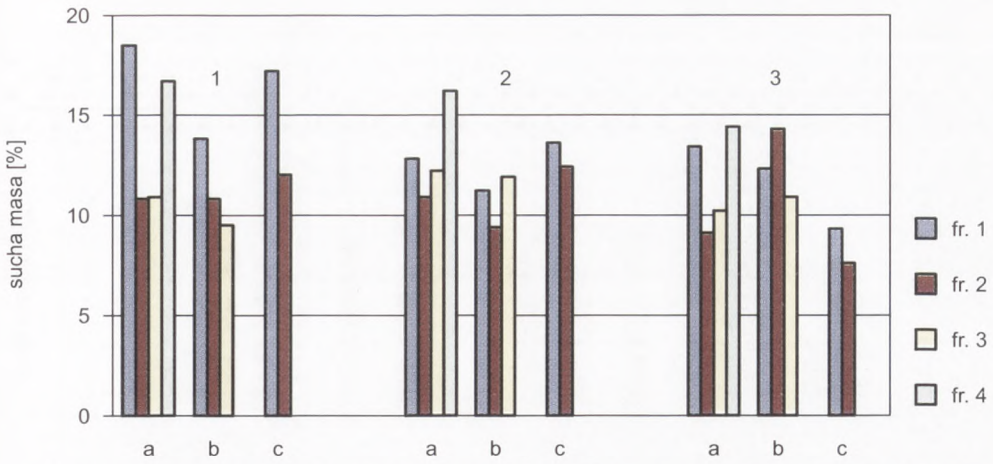
\* litery przy wartościach stanowią wyniki statystycznego testu Duncana

Wzrost stężenia 2,4-D z 0,5 do 2 mg·dm<sup>-3</sup> znacznie ograniczał kiełkowanie i stymulował przyrost świeżej masy kalusa, dlatego do dalszych badań wybrano pożywkę z wyższą zawartością hormonu. W drugim etapie badań oceniano zdolności regeneracyjne fragmentów dojrzałych zarodków pochodzących z suchych nasion. Zarodki cięto na 2, 3 lub 4 fragmenty (rys. 1A, B, C). Trzeci etap dotyczył zarodków niedojrzałych, które ze względu na niewielkie rozmiary cięte były prostopadle do osi na 3 części (fragmenty 2 i 3 z rys. 1C traktowane były jako całość). Istotną różnicę zaobserwowano w zdolności kiełkowania eksplantów (tab. 1 i 2). Dojrzałe zarodki kiełkowały w najmniejszym procencie. Natomiast kalus zaindukowany na wszystkich rodzajach eksplantów charakteryzował się porównywalną świeżą i suchą masą, oraz podobnymi zmianami w wielkości komórek. Dlatego wartości tych wskaźników przedstawiono tylko dla dojrzałych zarodków (rys. 2-6). Wykazano, że niezależnie od rodzaju zarodka największą przydatność dla indukcji kalusa posiadają fragmenty pochodzące z jego centralnej części (oznaczone: 2 lub Ś). Dla tych obiektów zaobserwowano największy przyrost świeżej masy tkanki kalusowej, optymalne cechy morfologiczne i pojawienie się centrów merystematycznych. Kalus taki charakteryzował się również drobniejszymi (rys. 3), owalnymi komórkami, intensywnie dzielącymi się, wypełnionymi gęstą cytoplazmą, wynikiem czego była wysoka zawartość suchej masy (rys. 2). Sumaryczna masa wszystkich fragmentów zliczona w obrębie fragmentacji jednego rodzaju, jak się okazało, była największa dla zarodków ciętych na 4 części prostopadle do osi.

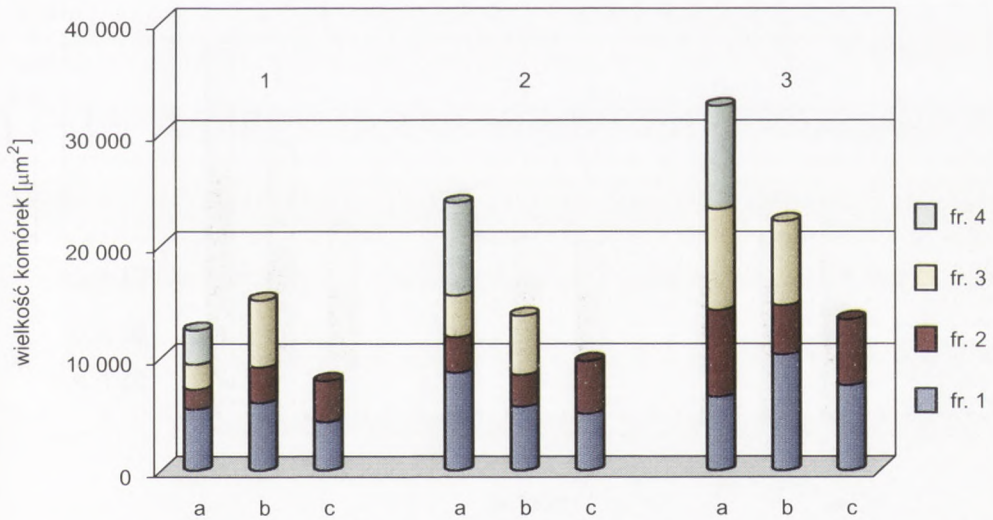
Tabela 2

## Kiełkowanie fragmentów dojrzałych i niedojrzałych zarodków w (%) kiełkujących pędów

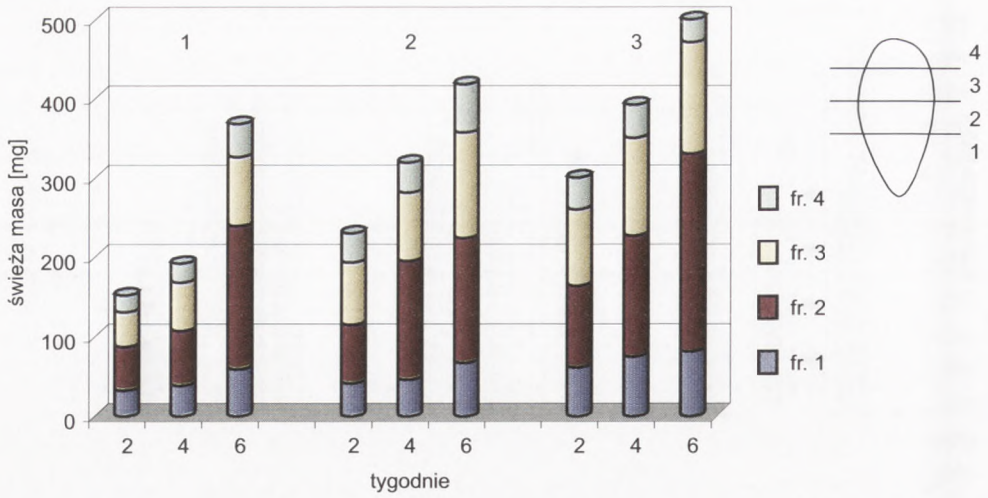
Fragmenty	S245 x Co255			K103 X K85			KOC9431		
	dojrzałe zarodki								
1, L, L	4	30	58	0	8	35	0	24	68
2, Ś, P	12	46	8	5	54	41	5	59	46
3, P	42	13		9	8		45	20	
4	30			46			47		
niedojrzałe zarodki									
1	–			5			7		
2	–			98			99		
3	–			57			53		



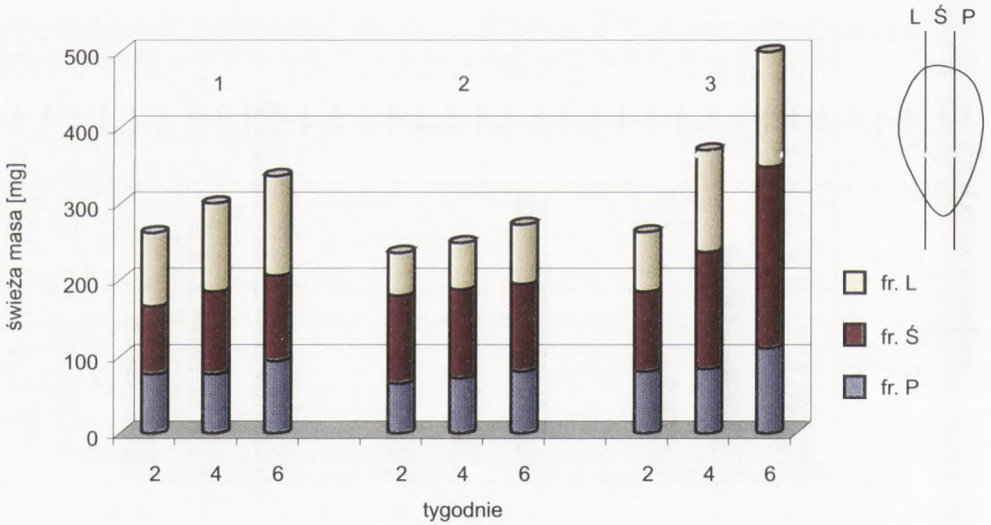
Rys. 2. Procentową zawartość suchej masy zarodków ciętych na a – 4, b – 3 i c – 2 części, formy kukurydzy: 1 – S245 x Co255, 2 – K103 x K85 i 3 – KOC 9431.



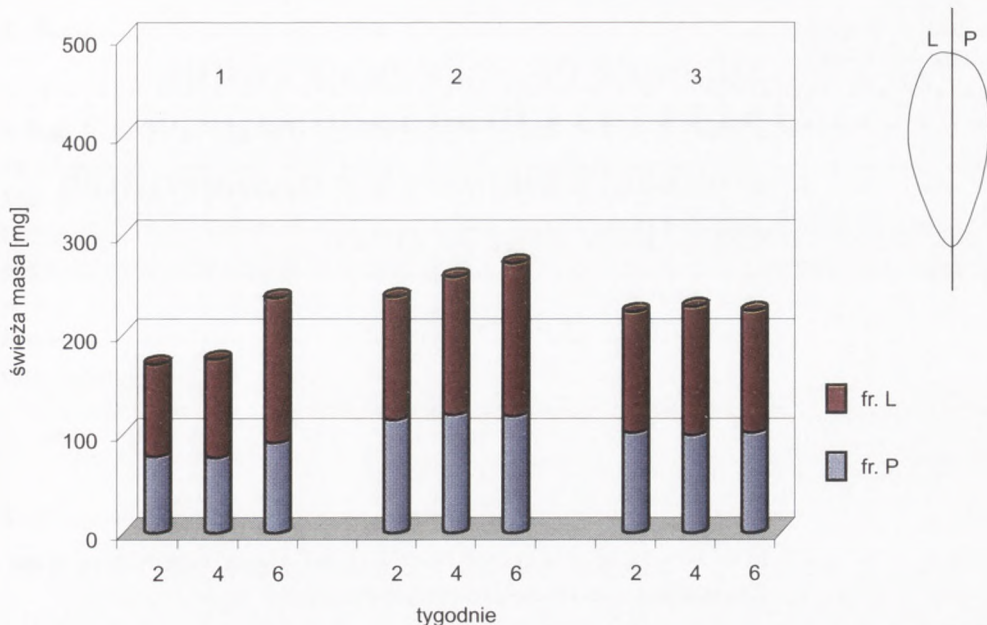
Rys. 3. Średnia wielkość komórek w preparatach rozgniotowych z zarodków ciętych na a – 4, b – 3 i c – 2 części, formy kukurydzy: 1 – S245 x Co255, 2 – K103 x K85, 3 – KOC 9431.



Rys. 4. Świeża masa zarodków ciętych na 4 fragmenty, formy kukurydzy: 1 – S245 x Co255, 2 – K103 x K85, 3 – KOC 9431.



Rys. 5. Świeża masa zarodków ciętych na 3 fragmenty, formy kukurydzy: 1 – S245 x Co255, 2 – K103 x K85, 3 – KOC 9431.



Rys. 6. Świeża masa zarodków ciętych na 2 fragmenty, formy kukurydzy: 1 – S245 x Co255, 2 – K103 x K85, 3 – KOC 9431.

Rozpatrując zjawisko konkurencji kiełkowania i indukcji kalusa należy pamiętać o jego złych i dobrych stronach. Proces kiełkowania jest niekorzystny, gdy celem doświadczenia jest uzyskanie jedynie tkanki kalusowej. Natomiast w eksperymentach związanych ze skróceniem lub pominięciem okresu spoczynku nasion przyspieszenie kiełkowania przez hodowlę zarodków *in vitro* umożliwia otrzymanie następnego pokolenia roślin w tym samym sezonie wegetacyjnym (4).

## Literatura

1. Marcińska I., (1994), *Określenie zdolności tkanki kalusowej pszenicy do przenoszenia informacji o rozwoju generatywnym*, praca doktorska, Kraków.
2. Zenkteler M., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, PWN, Warszawa.
3. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
4. Dietrich K., (1924), *Flora*, 117, 379-417.