



## Embriogeneza somatyczna soi

Jerzy Nawracała<sup>1</sup>, Xinan Zhou<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań

<sup>2</sup>Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Science, Wu-han

### Somatic embryogenesis of soybean

#### Summary

The possibility of induction of somatic embryogenesis in Polish and Chinese soybean cultivars was studied. Cotyledons from immature embryos as explants were used. Somatic embryos were obtained on MS medium with 40 mg l<sup>-1</sup> of 2,4-D after 3-4 weeks of culture. Embryos appeared on 45,5% of Polan explants and the highest average number of somatic embryos per explant – 29,2 was produced by cultivar Polan, too. The best development of somatic embryos was observed on the MS medium with 0,5 mg l<sup>-1</sup> KT and 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA and next on the hormone free medium with 60,0 g l<sup>-1</sup> of sucrose and 0,5% activated charcoal.

#### Key words:

soybean, somatic embryogenesis.

### 1. Wstęp

Po raz pierwszy zregenerowano rośliny soi drogą embriogenezy somatycznej w połowie lat osiemdziesiątych (1,2). Najlepszym eksplantatem do embriogenezy bezpośredniej okazały się liścienie z niedojrzałych zarodków zygotycznych, a najczęściej wykorzystywanym do indukcji hormonem – 2,4-D (kwas 2,4-dwu-chlorofenoksyoctowy) (3). Problemem w embriogenezie somatycznej u soi jest jej duża zależność od genotypu (4) oraz trudności z kiełkowaniem i konwersją zarodków. Celem pracy było sprawdzenie możliwości indukowania przez TDZ (tidiazuron) embriogenezy somatycznej u soi oraz znalezienie najlepszych pożywek różnicujących do kiełkowania zarodków somatycznych.

#### Adres do korespondencji

Jerzy Nawracała,  
Katedra Genetyki  
i Hodowli Roślin,  
Akademia Rolnicza  
im. A. Cieszkowskiego,  
ul. Wojska Polskiego 71c,  
60-625 Poznań.

#### biotechnologia

2 (53) 122–125 2001

## 2. Materiał i metoda

Materiał do badań stanowiły trzy polskie odmiany soi Polan, Aldana, Gaj i chińska odmiana Taixin Heidou. Z roślin rosnących w szklarni zbierano strąki zawierające niedojrzałe nasiona o wielkości 4-5 mm, odkażano, wycinano z niedojrzałych zarodków liścienie i wykładano odosiową stroną na pięć pożywek indukujących. Wszystkie pożywki oparte na pożywce MS (5) z dodatkiem 30 g l<sup>-1</sup> sacharozy i 7 g l<sup>-1</sup> agaru różniły się zawartością 2,4-D i TDZ: MS I – 2,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, MS II – 40,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, MS III – 2,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,25 mg l<sup>-1</sup> TDZ, MS IV – 40,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,25 mg l<sup>-1</sup> TDZ, MS V – 0,25 mg l<sup>-1</sup> TDZ. W każdej kombinacji wyszczepiono 20 eksplantatów, które umieszczano w pokoju hodowlanym w temperaturze 26°C i 16-godzinnym dniu. Po 4-6 tygodniach struktury zarodkowe przenoszono na 12 pożywek różnicujących (opartych na pożywce MS), zawierających różne kombinacje 2,4-D, KT (kinetyna) i BA (6-benzyloaminopuryna) oraz modyfikowanych witaminami z pożywki B5 (6), zwiększoną zawartością sacharozy lub dodatkiem węgla (tab. 1).

Tabela 1

Skład niektórych pożywek różnicujących zastosowanych w doświadczeniu

Pożywka	Makro- i mikroelementy	Witaminy	KT (mg l <sup>-1</sup> )	BA (mg l <sup>-1</sup> )	Sacharoza (mg l <sup>-1</sup> )	Węgiel aktywny (%)
D2	MS	MS	0,5	0,5	30,0	
D3	MS	MS	1,0		30,0	
D4	MS	MS		1,0	30,0	
D7	MS	B5	0,5	0,5	30,0	
D10	MS	B5			60,0	0,5

## 3. Wyniki

Po dwóch tygodniach kultury niedojrzałych liścieni soi na pożywkach indukujących obserwowano na eksplantatach pojawienie się różnych rodzajów kalusa. Tworzył się on na brzegach liścieni lub całych eksplantatach i różnił w zależności od pożywki indukującej. Na pożywce MS I rozwijał się głównie luźny kalus koloru żółtego, natomiast na pożywce MS V rósł kalus intensywnie zielony. Najintensywniejszy wzrost kalusa obserwowano na pożywce MS I, MS III i MS V, na których to pożywkach po trzech tygodniach kultury kalus pokrył całe eksplantaty. Na eksplantatach wyszczepionych na pożywkę MS II kalus pojawiał się sporadycznie tylko na brzegach eksplantatów.

Zarodki somatyczne otrzymano po 3-4 tygodniach kultury jedynie na pożywce MS II zawierającej 40 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D. Prawie połowa eksplantatów odmiany Polan (tab. 2) wytworzyła zarodki somatyczne z jednocześnie największą średnią liczbą zarodków na eksplantat (29,2). Niektóre eksplantaty były całkowicie pokryte zarodkami

somatycznymi (fot. 1-A). Na eksplantatach chińskiej odmiany Taixin Heidou<sub>1</sub> urosło średnio tylko 1,5 zarodka. Kuliste struktury zarodkowe rozwijały się w zarodki somatyczne w stadium torpedy i zarodki liścieniowe w zależności od pożywki różniującej (tab. 3) (fot. 1-B, C, D). Najlepiej zarodki rozwijały się kiedy były najpierw przełożone na pożywkę z dodatkiem 0,5 mg l<sup>-1</sup> KT i 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA, a następnie na pożywkę bez hormonów, ale z 60,0 g l<sup>-1</sup> sacharozy i 0,5% dodatkiem węgla aktywnego. W tej kombinacji oraz w przypadku wyłożenia struktur zarodkowych bezpośrednio na pożywkę bez hormonów, odnotowano największy procent zarodków normalnie się rozwijających (odpowiednio 33,3 i 34,1%). Najwięcej zarodków zdeformowanych, przeważnie wieloliścieniowych, tworzyło się na pożywce z dodatkiem 1,0 mg l<sup>-1</sup> KT (tab. 3).

Tabela 2

**Procent eksplantatów tworzących zarodki somatyczne i średnia liczba zarodków somatycznych na eksplantacie u czterech genotypów soi na pożywce MS II**

Genotyp	Procent eksplantatów tworzących zarodki	Średnia liczba zarodków na eksplantacie
Polan	45,5	29,2
Aldana	27,3	7,0
Gaj	27,0	7,3
Taixin Heidou	18,2	1,5

Tabela 3

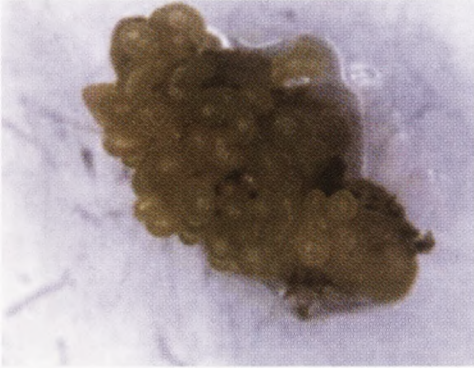
**Procent prawidłowo rozwiniętych i zdeformowanych zarodków somatycznych soi w zależności od pożywki różniującej**

Kombinacja	Zarodki prawidłowe	Zarodki lejkowate	Zarodki jednoliścieniowe	Zarodki wieloliścieniowe
D2 → D10	33,3	16,7	16,6	33,3
D3	10,0	26,7	6,6	56,7
D3 → D10	16,7	16,7	33,3	33,3
D4 → D10	19,0	23,8	38,1	19,0
D7 → D10	10,3	66,7	5,1	17,9
D10	34,1	13,6	20,5	31,8

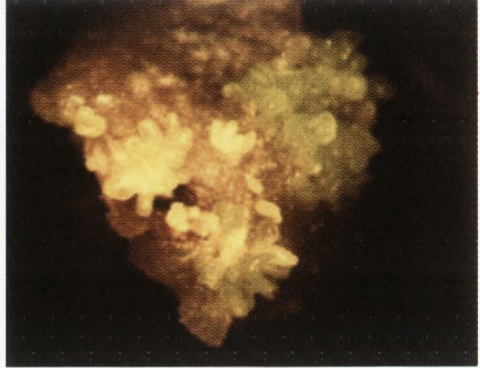
#### 4. Dyskusja

Zakres stężeń 2,4-D stosowanych przez badaczy do indukcji embriogenezy u soi był bardzo szeroki. Komatsuda i Ohyama (4) otrzymali zarodki na pożywce zawierającej 2,0 mg l<sup>-1</sup>, Lazzeri i in. (7) stosował 10 mg l<sup>-1</sup>, a Santarem i in. (8) 181 μM l<sup>-1</sup>. W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowano zarówno niskie (2,0 mg l<sup>-1</sup>) jak i wysokie (40,0 mg l<sup>-1</sup>) stężenie 2,4-D w pożywce. Zarodki somatyczne otrzymano

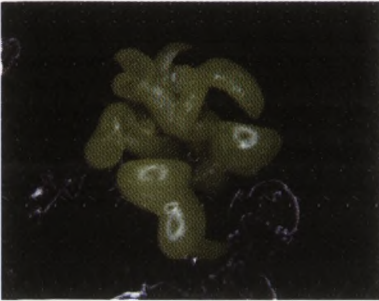
A



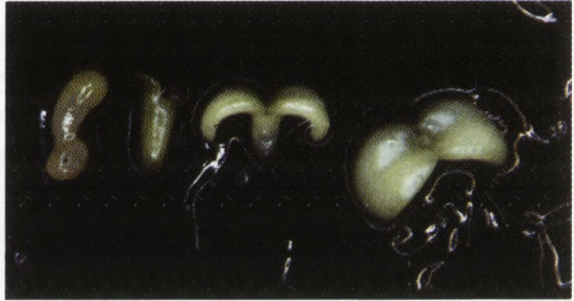
B



C



D



Fot. 1. (A) Zarodki somatyczne globularne na eksplantacie odmiany Polan na pożywce indukującej ( $40,0 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D). (B) Rozwój zarodków somatycznych na eksplantacie odmiany Polan. (C) Zarodki somatyczne soi w stadium liścieni na pożywce różnicującej D10. (D) Stadia rozwoju zarodków somatycznych soi na pożywce różnicującej D10.



tylko kiedy liścienie z niedojrzałych zarodków były wyszczepione na pożywkę zawierającą 40 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D. Zastosowane małe stężenie 2,4-D (2,0 mg l<sup>-1</sup>), samo lub w kombinacji z TDZ nie dało efektu. Dodatek tidiazuronu do pożywki zawierającej 40,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D zahamował tworzenie się zarodków somatycznych. Wyniki te nie potwierdziły doniesienia Gai i Guo (9), którzy otrzymali kalus embriogeniczny po zastosowaniu pożywki zawierającej 0,25 mg l<sup>-1</sup> TDZ.

Różnice pomiędzy genotypami w efektywności embriogenezy somatycznej u soi są bardzo duże (10). Podobne różnice pomiędzy genotypami odnotowano w przeprowadzonym doświadczeniu. Odmiana Polan charakteryzowała się bardzo wysoką efektywnością embriogenezy (średnio 29,2 zarodka somatycznego na eksplantat), podczas gdy chińska odmiana Taixin Heidou tworzyła na nielicznych eksplantatach (18,2%) tylko pojedyncze zarodki (1,5). Rozwój powstałych zarodków somatycznych zależy od składu pożywek różnicujących i dojrzewających. Najlepsze efekty otrzymywano stosując cytokininy do pobudzenia kiełkowania zarodków lub pożywki bez dodatku hormonów do dalszego wzrostu zarodków (3). Podobnie w przeprowadzonym doświadczeniu największy procent zarodków rozwijających się normalnie (34,1 i 33,3%) odnotowano na pożywce bez hormonów, ale z 60,0 g l<sup>-1</sup> sacharozy i 0,5% dodatkiem węgla aktywnego oraz na pożywce z dodatkiem 0,5 mg l<sup>-1</sup> KT i 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA.

## 5. Wnioski

1. Pożywka zawierająca 40,0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D indukowała embriogenezę somatyczną u czterech genotypów soi.

2. Najlepszą pożywką dla rozwoju zarodków somatycznych była pożywka MS bez hormonów z dodatkiem witamin z pożywki B5, 60,0 g l<sup>-1</sup> sacharozy i 0,5% dodatkiem węgla aktywnego oraz pożywka MS z dodatkiem 0,5 mg l<sup>-1</sup> KT i 0,5 mg l<sup>-1</sup> BA.

3. Obserwowano różnice genotypowe w zdolności do embriogenezy somatycznej. Odmiana Polan charakteryzowała się dużą embriogenicznością.

## Literatura

1. Lazzeri P. A., Hildebrand D. F., Collins G. B., (1985), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 3, 160-167.
2. Ranch J. P., Oglesby L., Zielinski A. C., (1985), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 21, 653-657.
3. Griga M., (1999), *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*, Pers Publishers, Prague, 233-250.
4. Komatsuda T., Ohshima K., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 75, 695-700.
5. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
6. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
7. Lazzeri P. A., Hildebrand D. F., Collins G. B., (1987a), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10, 209-220.
8. Santarem E. R., Pelissier B., Finer J. J., (1997), *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 33, 13-19.
9. Gai G. Y., Guo Z., (1997), *Soybean Genetics Newsletter*, 24, 41-44.
10. Rajasekaran, K., Pellow J. W., (1997), *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 33, 88-91.