



## Wpływ kwasu salicylowego, inhibitora biosyntezy jasmonidów, na wzrost zawiesiny embriogennej, rozwój somatycznych zarodków oraz ich regenerację w kulturach *Medicago sativa* L.

Ewa Kępczyńska, Sylwia Zielińska

Zakład Biotechnologii, Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin,  
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

**The effect of salicylic acid, jasmonates biosynthesis inhibitor on cell suspension growth, development and regeneration of somatic embryos in *Medicago sativa* L. tissue cultures**

### Summary

The effect of salicylic acid (SA) applied during the proliferation phase of cell suspension *in vitro* regeneration system of *Medicago sativa* L. on cell suspension growth, production of somatic embryos and their following development, germination and conversion were examined. SA is a potent inhibitor of the above processes. It is suggested that endogenous jasmonates are of some importance in regulation of somatic embryogenesis.

### Key words:

salicylic acid, *Medicago sativa*, somatic embryogenesis, germination and conversion of somatic embryos, tissue culture.

### Adres do korespondencji

Ewa Kępczyńska,  
Zakład Biotechnologii,  
Katedra Fizjologii  
i Biotechnologii Roślin,  
Wydział Nauk  
Przyrodniczych,  
Uniwersytet Szczeciński,  
ul. Wąska 13,  
71-415 Szczecin.

## 1. Wstęp

Somatyczna embriogeneza jest procesem, w wyniku którego z komórek somatycznych tworzą się zarodki morfologicznie i fizjologicznie podobne do zarodków zygotycznych. Proces ten może zachodzić w warunkach *in vivo* lub *in vitro* (1). Do tej pory

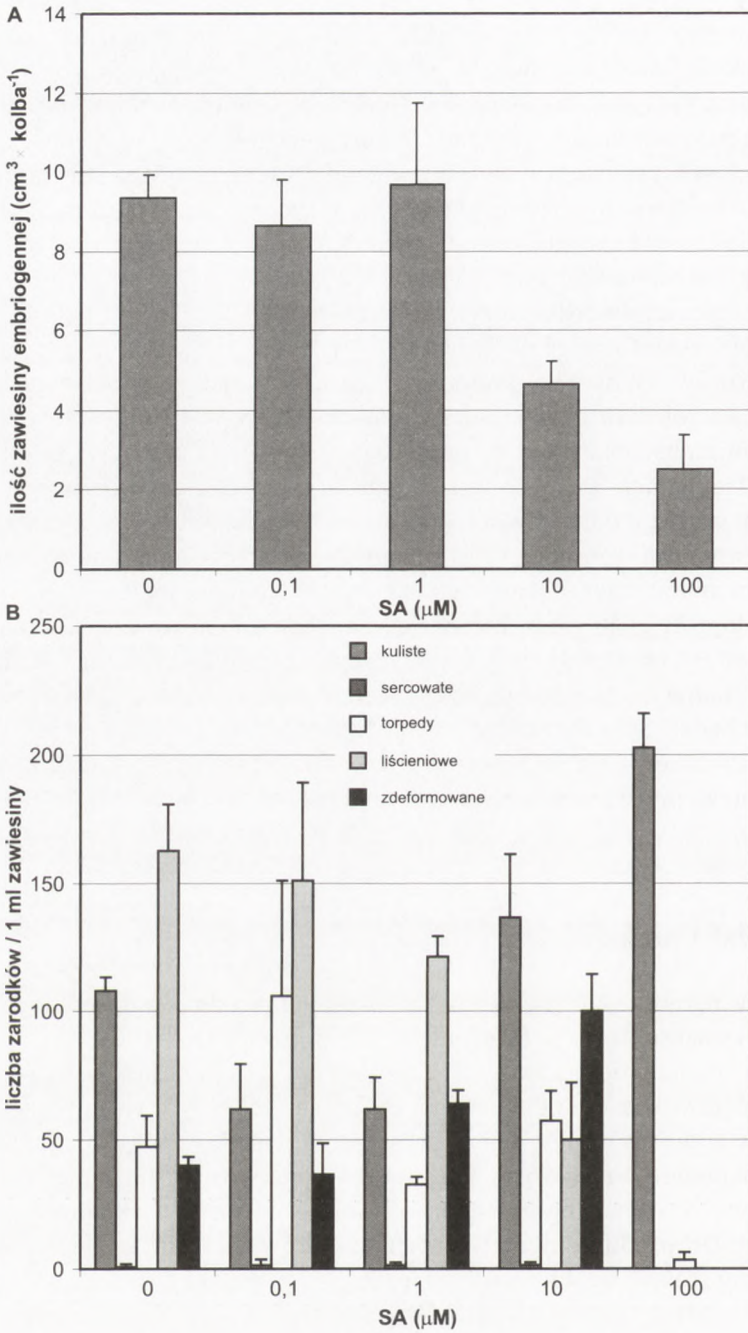
opublikowano kilkadziesiąt prac na temat embriogenezy lucerny, wykorzystano różne pożywki, gatunki, odmiany lub linie. Wiele różnych czynników wpływa na poszczególne etapy somatycznej embriogenezy – genotyp, stan fizjologiczny rośliny donora, jakość i natężenie światła, a także stężenie i rodzaj regulatorów w pożywkach. Te ostatnie czynniki niewątpliwie pełnią zasadniczą funkcję, decydując o uzyskaniu embriogeniczności i przebiegu embriogenezy oraz jej wydajności. Znaczenie poszczególnych regulatorów w embriogenezie można ocenić na podstawie ich wpływu po aplikacji do pożywek. Przydatna w tych badaniach jest możliwość stosowania inhibitorów biosyntezy lub działania fitohormonów. Ustalono, wykorzystując tę metodę, znaczenie etylenu (2), kwasu abscysynowego (3) oraz giberelin (4) w procesie somatycznej embriogenezy *Medicago sativa* L.

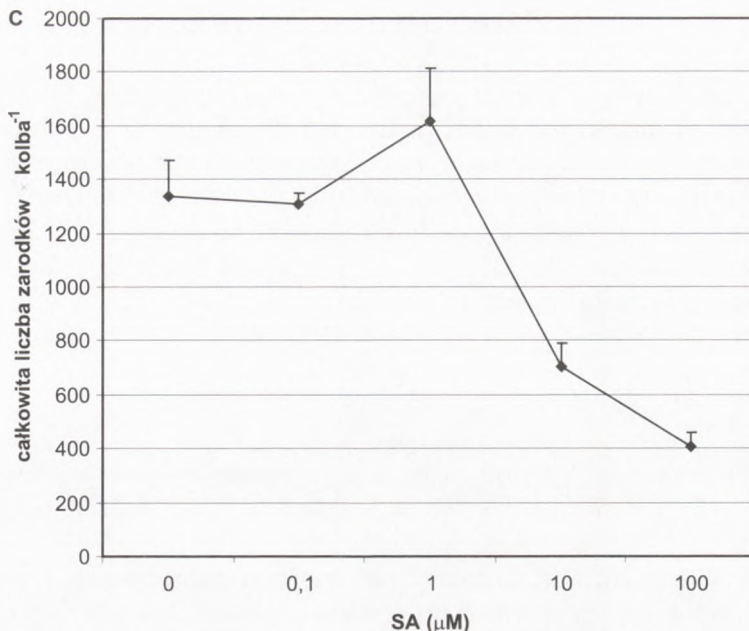
Niewiele jest informacji dotyczących udziału związków jasmonowych i stosowania inhibitorów ich syntezy podczas procesu somatycznej embriogenezy lucerny i tym samym roli tych fitohormonów w omawianym procesie. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że egzogeny ester metylowy kwasu jasmonowego (JA-Me) hamuje zarówno wzrost kalusa, zaindukowany obecnością 2,4-D i kinetyny (5), jak też indukcję tworzenia somatycznych zarodków w kulturach tkankowych lucerny *Medicago sativa* L. (2). Zablockowanie biosyntezy jasmonidów z wykorzystaniem inhibitorów enzymów katalizujących ich biosyntezę, antypiryny, ibuprofenu i indoprofenu (6) oraz kwasu salicylowego (7) spowodowało zahamowanie wzrostu kalusa oraz tworzenia somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. sugerując, że endogenne jasmonidy są potrzebne w regulacji tych procesów (1,3,8).

Celem badań było określenie roli endogennych jasmonidów w rozwoju somatycznych zarodków oraz ich regeneracji w warunkach *in vitro* poprzez zablockowanie ich biosyntezy przez kwas salicylowy zaaplikowany w czasie wzrostu zawiesiny embriogennej.

## 2. Materiał i metody

Rośliny mateczne lucerny siewnej *Medicago sativa* odm. Rangelander, z której pobierano eksplanty, rosły w fitotronie w kontrolowanych warunkach – wilgotność 70%, 16 h oświetlenie o natężeniu  $120 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura  $24^{\circ}\text{C}$ . Ze zdrowych, młodych pędów ścinano ogonki liściowe trzech pierwszych węzłów niekwitnących pędów i sterylizowano je kolejno przez zanurzenie w 75% (v/v) etanolu na 20 s, w 3,5% roztworze podchlorynu sodu na 3-4 min, 3-krotne płukanie sterylną wodą destylowaną. Następnie ogonki te przycinano na odcinki 1 cm stanowiące eksplanty pierwotne. Do produkcji somatycznych zarodków zastosowano metodę McKersie (9), w której stosuje się 4 pożywki stałe: SH – indukującą z dodatkiem 1 mg/l 2,4-D i 0,2 mg/l kinetyny oraz 4,35 g/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 288 mg/l proliny, 53 mg/l tioproliny i 200 mg/l mioinozytolu; BOi2Y – różnicującą bez hormonów; dojrzewającą BOi2Y + 20  $\mu\text{M}$  ABA; konwersyjną – MS bez hormonów i jedną płynną, namnażającą – B<sub>5</sub>g





Wykres 1. Wpływ SA na ilość zawiesiny embriogennej (A) w pożywce płynnej B<sub>5</sub>g oraz na liczbę somatycznych zarodków w poszczególnych stadiach rozwojowych (B) i całkowitą liczbę zarodków (C) na pożywce różnicującej BOi2Y. Gęstość zawiesiny określano po 10 dniach inkubacji. Rodzaj i liczbę somatycznych zarodków określano po 14 dniach różnicowania na pożywce BOi2Y.



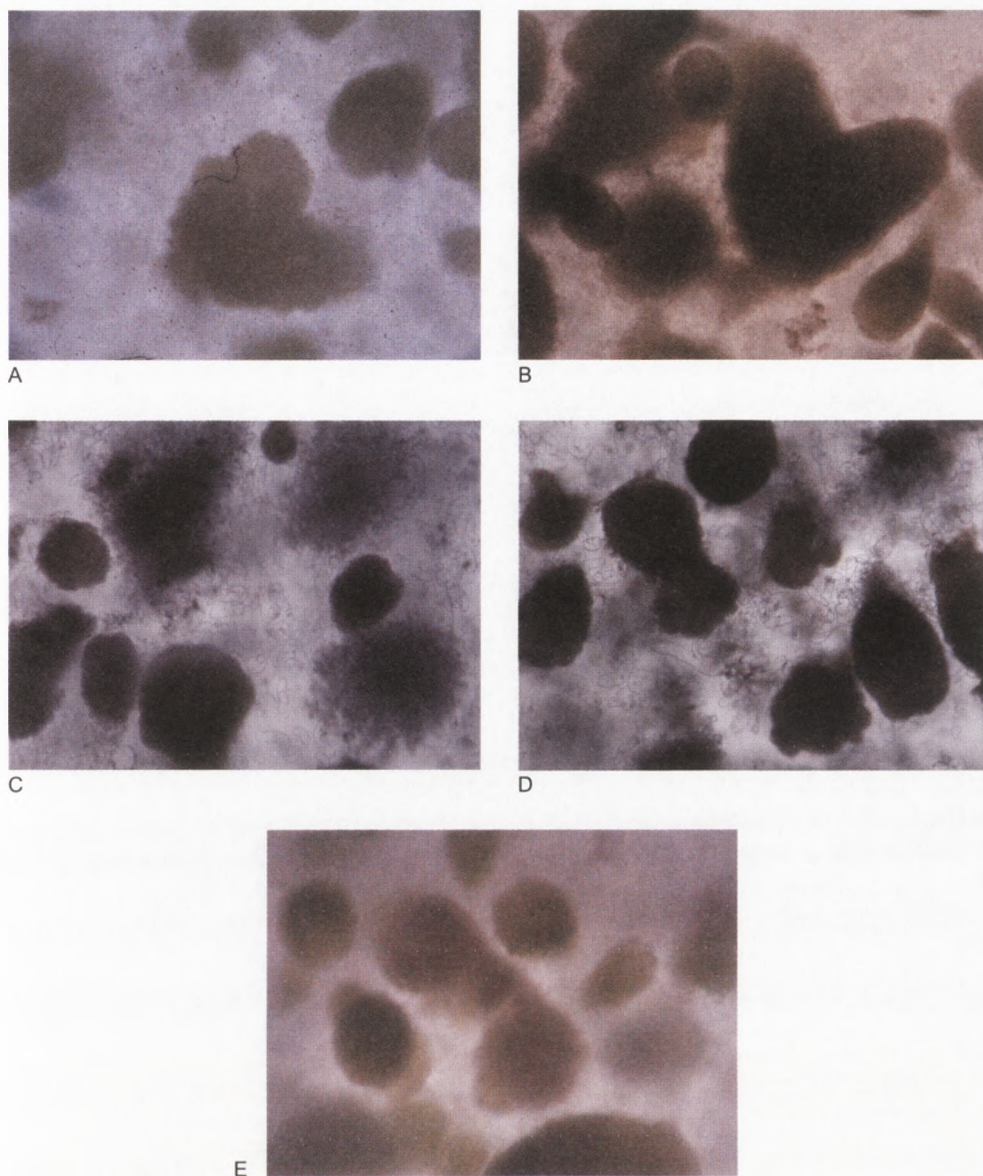
zawierającą 1 mg/l 2,4-D i 0,1 mg/l NAA. Kultury na pożywkach stałych inkubowano w komorze fitotronowej Sanyo przy 16 h oświetleniu o natężeniu  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Tkanka kalusowa wyrosła na pożywce indukującej po czterech dniach stanowiła eksplant wtórny (0,5 g) do zainicjowania kultury zawiesinowej. Kwas salicylowy (SA) w zakresie stężeń 0,1-100  $\mu\text{M}$  dodawano do pożywki namnażającej przed autoklawowaniem. Po 10-dniowej inkubacji w wytrząsarce Innova (temp.  $25^\circ\text{C}$ , 16 h światła o natężeniu  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , amplituda 120 rpm) otrzymywano niejednorodną kulturę zawiesinową, którą przesiewano w celu wyodrębnienia frakcji embriogennej (poniżej 500  $\mu\text{m}$ ). Gęstość zawiesiny określano po 1 h. Jeden ml zawiesiny наносило на сіатки (średnica oczek 200  $\mu\text{m}$ ), które po odsączeniu na sterylnej bibule filtracyjnej wykładano na pożywkę różnicującą (14 dni), następnie po 38 dniach od indukcji określano stadia i liczbę wytworzonych zarodków i przenoszono na pożywkę dojrzewającą (7 dni, do żółknięcia zarodków). Następnie zarodki suszono 1 h na powietrzu w komorze laminarnej, a potem przechowywano w ekcykatorach z nasyconym roztworem  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , aby utrzymać stałą względną wilgotność powietrza.

20 zarodków przenoszono na szalki Petriego zawierające pożywkę konwersyjną. Szalki zaklejano parafilmem, aby nie dopuścić do zakażenia i wysuszenia i przenoszono do komory fitotronowej do wcześniej opisanych warunków. Po 7 dniach liczono procent skielkowanych zarodków; za skielkowane uznawano zarodki, u których pojawił się korzonek zarodkowy długości powyżej 2 mm. W czternastym dniu inkubacji określano procent konwersji zarodków; za kryterium konwersji przyjęto zazielenienie liścieni i wykształcenie co najmniej 1 trójlistkowego liścia.

Wszystkie doświadczenia wykonano w 5 powtórzeniach. Do statystycznego opracowania wyników stosowano odchylenie standardowe (SD).

### 3. Wyniki i dyskusja

Kwas salicylowy zaaplikowany w trakcie namnażania zawiesiny komórkowej w stężeniu 0,1 i 1  $\mu\text{M}$  miał wpływ na proliferację tkanki embriogenicznej (wykres 1A). Podwyższenie stężenia tego inhibitora biosyntezy jasmonidów do 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  spowodowało zahamowanie proliferacji zawiesiny komórkowej, gęstość zawiesiny po 10 dniach inkubacji zmniejszyła się odpowiednio dwu- i czterokrotnie. Stwierdzono także hamujący wpływ SA na rozwój somatycznych zarodków podczas namnażania zawiesiny embriogenicznej. Po 10 dniach inkubacji w zawieszynie pod nieobecność SA i przy niskiej jego zawartości (fot. 1A, B) obserwowano pojawianie się nielicznych zarodków sercowatych. W miarę zwiększania stężenia SA brak było zarodków w tym stadium (fot. 1C, D, E), a ponadto zawieszyna stawała się mętna (fot. 1E). Konsekwencją obecności kwasu salicylowego podczas namnażania zawiesiny komórkowej było zahamowanie rozwoju i liczby somatycznych zarodków z komórek prioembriogenicznych na pożywce różnicującej BOi2Y (wykres 1B, C, fot. 2A-E). W miarę zwiększania stężenia kwasu w pożywce namnażającej liczba zarodków somatycznych zmniejszała się i jednocześnie zwiększała się liczba zarodków we wczesnym stadium rozwoju (globularne) oraz zdeformowanych, a zmniejszała się liczba zarodków zaawansowanych w rozwoju (stadium torpedy i liścieniowe). Zmniejszenie liczby somatycznych zarodków *M. sativa* odm. Falcata wywołanych obecnością SA w stężeniu 10 i 20  $\mu\text{M}$  na stałej pożywce różnicującej MS nie zawierającej hormonów obserwowali Meijer i Brown (10). Z uzyskanych danych wynika, że SA jest inhibitorem wzrostu zawiesiny komórkowej oraz produkcji i rozwoju somatycznych zarodków *M. sativa* odm. Rangelander. Skoro kwas ten uznawany jest za inhibitor jasmonidów (7) można przypuszczać zatem, że te hormony roślinne są niezbędne podczas formowania się struktur zarodkowych w procesie somatycznej embriogenezy. Wiadomo jednak, że kwas salicylowy jest inhibitorem produkcji etylenu. Leslie and Romani (11) wykazali, że kwas ten w stężeniach 1-100  $\mu\text{M}$  hamował produkcję etylenu przez zawieszynę komórkową *Pyrus communis* poprzez blokowanie konwersji kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego, prekursora etylenu. Podanie aminoetoksywinyloglicyny (AVG), inhibitora biosyntezy etylenu, podczas namna-



Fot. 1. Wpływ kwasu salicylowego na proliferację zawiesiny embriogennej *Medicago sativa* L.: A – 0  $\mu\text{M}$  SA; B – 0,1  $\mu\text{M}$  SA; C – 1  $\mu\text{M}$  SA; D – 10  $\mu\text{M}$  SA; E – 100  $\mu\text{M}$  SA.

żania zawiesiny komórkowej *M. sativa* odm. Rangelander spowodowało zmniejszenie liczby wytworzonych zarodków oraz ich opóźnienie w rozwoju (badania własne, dane nie publikowane), a zatem hamujące działanie kwasu salicylowego może z jednej strony wynikać z jego wpływu na biosyntezę jasmonidów – i z drugiej, na bio-



A



B



C



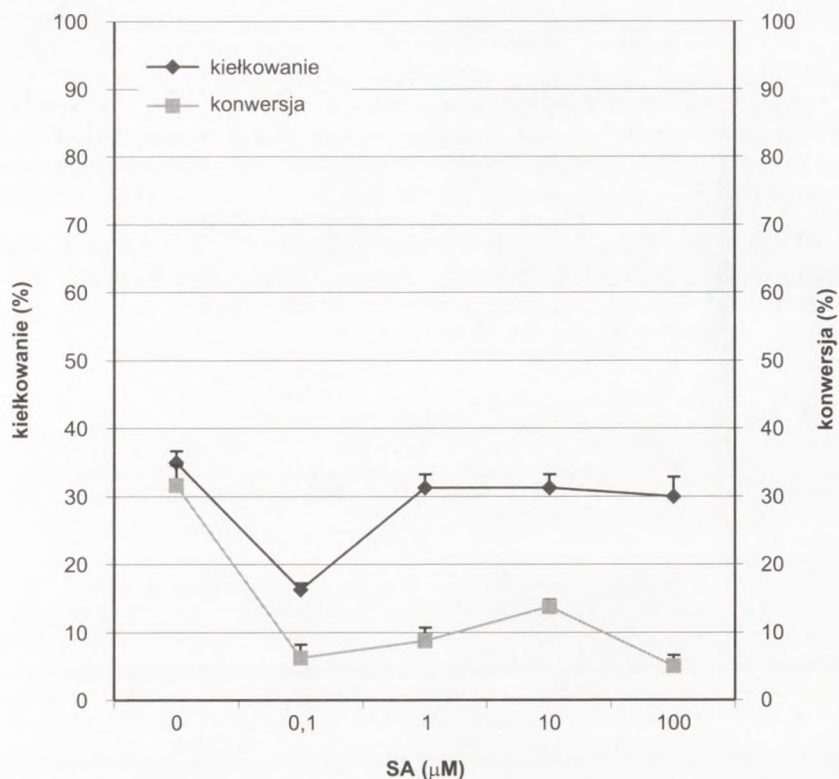
D



E

Fot. 2. Wpływ kwasu salicylowego zaaplikowanego do pożywki płynnej B<sub>5</sub>g na różnicowanie się somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. na pożywce BOI2Y: A – 0 μM SA; B – 0,1 μM SA; C – 1 μM SA; D – 10 μM SA; E – 100 μM SA.

syntezę etylenu. Interesujące było sprawdzenie, czy kwas salicylowy zaaplikowany do zawiesiny komórkowej będzie modyfikował regenerację otrzymanych zarodków somatycznych. W tym celu wysuszone zarodki poddano kiełkowaniu, a następnie



Wykres 2. Wpływ SA zaaplikowanego w fazie namnażania na kielkowanie (po 7 dniach inkubacji) i konwersję (po 14 dniach inkubacji) somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. na pożywce MS.

obserwowano ich zdolność do regeneracji. Okazało się, że z wyjątkiem stężenia 0,1  $\mu\text{M}$  kwas ten nie miał wpływu na pojawianie się korzonka zarodkowego, natomiast we wszystkich stosowanych stężeniach ograniczał bardzo wyraźnie konwersję somatycznych zarodków (wykres 2).

Na podstawie uzyskanych wyników, wskazuje się, że kwas salicylowy, inhibitor biosyntezy jasmonidów, zastosowany w fazie wzrostu zawiesiny komórkowej *Medicago sativa* odm. Rangelander jest inhibitorem proliferacji zawiesiny embriogenicnej, tworzenia, rozwoju i konwersji somatycznych zarodków. Prawdopodobnie hamuje on biosyntezę jasmonidów, które, jak się wydaje, są niezbędne podczas rozwoju zarodków.

#### Literatura:

1. Kępczyński J., Kępczyńska E., (2001), *Biotechnologia*, 2 (53), 16-25.
2. Kępczyński J., Florek I., (1997), *Basic and Applied Aspects of Seeds Biology*, Eds. Ellis R. H., Black M., Murdoch A. J., Hong J. D., Kluwer Acad. Publ., 137-140.



3. Florek I., Kępczyński J., Kępczyńska E., (1998), Materiały konferencyjne „Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin”, ZFR PAN, Kraków, 81-84.
4. Ruduś I., Kępczyńska E., Kępczyński J., (2002), *Plant Growth Regul.*, 36, 91-95.
5. Florek I., Kępczyński J., (1994), *Prace Ogr. Bot.*, PAN 5/6, 217-221.
6. Vick B. A., Zimmermann D. C., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, 470-477.
7. Pan Z., Camara B., Gardner H. W., Backhaus R. A., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273 (29), 18139-18145.
8. Kępczyńska E., (2003), *Materiały sympozjalne, II Ogólnopolskie Sympozjum „Człowiek i środowisko przyrodnicze Pomorza Zachodniego”*, Szczecin – Łukęcin, (w druku).
9. McKersie B. D., van Acker S., Lai F. F. M., (1995), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 153-169.
10. Meijer E. G. M., Brown D. C. W., (1988), *J. Exp. Bot.*, 39 (199), 263-270.
11. Leslie C. A., Romani R. J., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 144-166.