

WSTĘPNE BADANIA NAD HODOWLĄ IZOLOWANYCH ZARODKÓW ROŚLIN STRĄCZKOWYCH W SZTUCZNYCH WARUNKACH

Z. TOMASZEWSKI

W dziedzinie hodowli roślin istnieje do dzisiaj szereg zagadnień dość skomplikowanych, które nastęrczają hodowcom i genetykom wiele trudności natury zarówno czysto empirycznej, jak i teoretycznej.

Stosowane dotychczas w hodowli roślin metody, jak krzyżowanie, selekcja, wychowywanie, aklimatyzacja, działanie bodźców zewnętrznych oraz hodowla mutacyjna i poliploidalna nie wyczerpują wszystkich możliwości otrzymania nowych lepszych form roślinnych.

Największe znaczenie spośród tych stosowanych metod w pracach hodowlanych ma krzyżowanie, które też i najczęściej jest stosowane. Krzyżowanie jest na ogół zabiegiem dość prostym, o ile krzyżuje się formy zbliżone do siebie i o ile jest wykonane we właściwym czasie i przy zastosowaniu odpowiednich metod. W wypadku gdy formy rodzicielskie różnią się między sobą składem genetycznym, właściwościami fizjologicznymi oraz budową morfologiczną narządów generatywnych — jest ono trudne. Z krzyżowaniami tego rodzaju ma się zwykle do czynienia w krzyżówkach międzygatunkowych i międzyrodzajowych.

Niemożność otrzymania mieszańców międzygatunkowych normalnie rozwiniętych, dobrze kiełkujących i owocujących zależy od wielu przyczyn, z których dwie zdają się posiadać decydujące znaczenie:

1) przyczyny tkwiące w naturze samego endospermu, który jako tkanka powstała w wyniku podwójnego zapładniania dwu różnych gatunków jest silnie zróżnicowany pod względem genetycznym,

2) przyczyny leżące w samym zarodku, w jego niewłaściwej budowie, nienormalnym rozwoju, czy odmiennych wymaganiach fizjologicznych.

W wyniku zachwiania równowagi środowiska przemiana materii w młodym organizmie mieszańca nie jest należycie zharmonizowana, wskutek czego następuje ograniczenie jego rozwoju, lub zmiana kierunku rozwoju, a nawet śmierć.

Nad otrzymaniem mieszańców międzygatunkowych łubinu *Lupinus luteus*, *L. angustifolius*, *L. albus* — pracowano dość intensywnie przez

szereg lat w Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR w Przebędowie jak i przy Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa WSR w Poznaniu.

W celu przewycięzenia trudności niekrzyżowania się generatywnego w/w gatunków łubinu stosowano różne znane, dostępne metody mające ułatwić krzyżowanie, jak stymulację znamienia, mieszanie pyłku, oraz uprzednie zbliżenie drogą szczepień wegetatywnych jednych gatunków na drugich. W czasie przeprowadzenia tych badań stwierdzono niejednokrotnie, że zapylenie i zapłodnienie istotnie zachodzi, czego dowodem jest zgrubienie zalążni i wykształcenie strączków, które po dłuższym lub krótszym czasie opadają, nie dochodząc nigdy do dojrzałości. Zaczęto więc szukać metod, przy zastosowaniu których można by młody niedojrzały zarodek, po odizolowaniu go od środowiska matczynego dalej hodować w sztucznych warunkach. Poza tym w odniesieniu do prac nad łubinem zastanawiano się czy przy użyciu metody hodowli izolowanych zarodków nie uda się zmniejszyć zawartości alkaloidów do minimum. Do powyższego założenia skłaniało nas to, że alkaloidy w łubinie występują tylko w liścieniach, podczas gdy zarodki są ich całkowicie pozbawione. Dlatego też zaczęto przypuszczać, że drogą odizolowania zarodków od liścieni i hodowania ich w sztucznych warunkach po kilku latach otrzyma się formy łubinu bezalkaloidowego.

Rozpracowanie tych zagadnień stało się jednym z tematów hodowlano-badawczych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin oraz Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa WSR w Olsztynie.

Na powyższy temat nie prowadzono dotychczas w Polsce żadnych prac, a w każdym razie nie publikowano. Czosnowski (1) i współpracownicy (2) prowadzili wprawdzie badania nad hodowlą wyizolowanych tkanek *in vitro*, jednak prace te potraktowane były wycinkowo i dotyczyły głównie charakterystyki tkanek różnych roślin jak i ich gospodarki witaminowej.

W opracowaniu metodyki badawczej nadającej się do hodowli izolowanych zarodków w sztucznych warunkach zarysowały się od samego początku dwa kierunki badań: 1) hodowla zarodków dojrzałych, 2) hodowla zarodków niedojrzałych.

Badania przeprowadzono przez 5 lat w okresie od 1953 do 1957 r.

Pierwsze 3 lata prowadzono je w Stacji Hodowlano-Badawczej IHAR w Przebędowie pod Poznaniem. Następne zaś dwa lata od 1956 do 1957 r. w pracowni Roślin Pastewnych IHAR, jak i w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa WSR w Olsztynie.

W pierwszych dwu latach badania prowadzono głównie nad zarodkami dojrzałymi, w następnych zaś, oprócz zarodków dojrzałych brano również zarodki niedojrzałe, które izolowano wprost w zalążni, bądź z dopiero co zawiązanych strąków, w różnych fazach ich rozwoju.

Hodowla zarodków niedojrzałych ze względu na to, że jest ona jakby przedłużeniem okresu embrionalnego zarodków poza organizmem roślinnym, wymaga dużej precyzji i dokładności metodyki badawczej oraz wnikliwości i umiejętności osób ją prowadzących. Natomiast hodowla zarodków dojrzałych tj. takich, które po ich oddzieleniu od nasienia są zdolne do kiełkowania jest łatwiejsza.

W pierwszym okresie badań chodziło głównie o poznanie warunków, w jakich należy prowadzić hodowlę zarodków tak dojrzałych, jak i niedojrzałych. Starano się więc ustalić: 1) jakich używać pożywek co do ich składu jakościowego i ilościowego, 2) jak wpływają warunki fizyczne (temp. światło i pH) na rozwój zarodków, 3) jakie należy stosować podłoże: stałe, płynne czy zestalone.

Materiałem doświadczalnym były zarodki odmian i gatunków z różnych roślin strączkowych, jak łubin żółty, biały i wąskolistny, tak formy pastewne jak i gorzkie, groch, peluszka, wyka, soja, soczewica, bobik oraz lędźwian.

Badania przeprowadzano w zależności od charakteru pracy i potrzeby w laboratorium, w szklarni, w inspektach czy wreszcie w polu.

W hodowli izolowanych zarodków dojrzałych w pierwszym okresie posługiwano się metodami dość prostymi. Zarodki wyizolowane z nasion po uprzednim ich namoczeniu wysadzano do doniczek, zawierających różne typy gleby jak: piasek, czysty płukany kwarc, ziemia ogrodowa i kompostowa i hodowano je w warunkach zwykłych. Zarodki w miarę potrzeby podlewano pożywką płynną, zawierającą potrzebne składniki mineralne i jako źródło węgla sacharozę w postaci cukru. W tych warunkach zarodki rozwijały się bardzo słabo i po pewnym czasie z tych czy innych przyczyn większa ich część ginęła.

W drugim etapie prac nad zarodkami zastosowano środowisko płynne. Wyizolowane zarodki hodowano przez pewien okres w warunkach sterylnych na pożywce płynnej, w probówkach. Gdy zarodki wytworzyły pierwszą parę listków i korzeni przenoszono je z warunków aseptycznych do zwykłych i dalej hodowano w pożywce płynnej na gazie rozpostartej na słojach (rys. 1, 2, 3).

Skład jakościowy i ilościowy pożywki dostosowanej do potrzeb zarodków dojrzałych przedstawiał się następująco:

KNO_3 — 0,5 g

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ — 0,1 g

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 0,1 g

MgSO_4 — 0,1 g

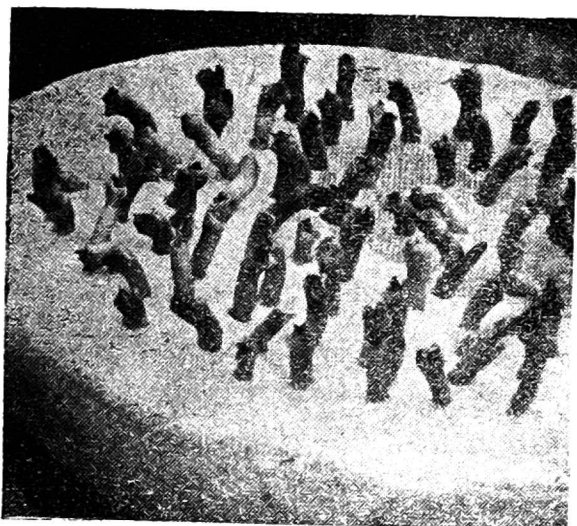
KCl — 0,1 g

3 ml 1% cytrynianu żelaza

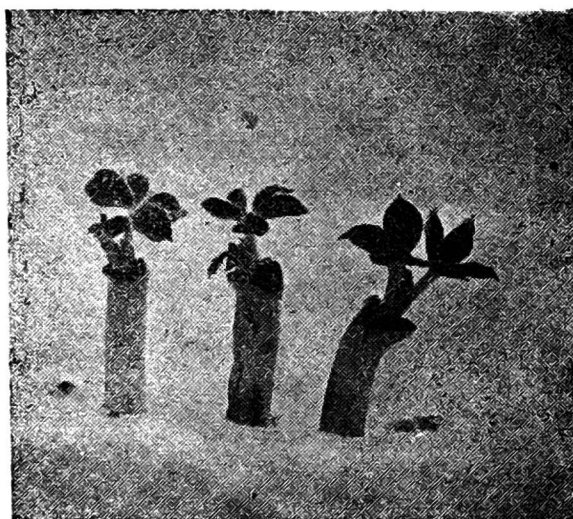
30 g sacharozy w postaci cukru

Łubin biały (*Lupinus albus*)

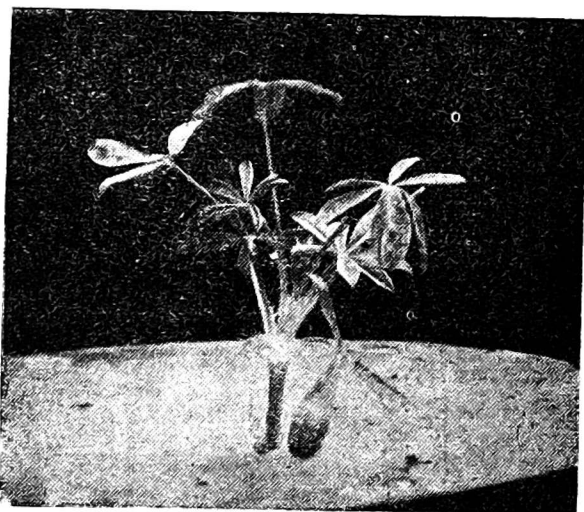
A. Zarodki hodowane w kulturach wodnych na sztucznej pożywce na rozpostartej gazie



Rys. 1. Zarodki w pierwszej fazie wzrostu



Rys. 2. Roślinki w fazie 2 listków



Rys. 3. Roślinki w fazie 6 listków

Dodatek 0,01 g humianu potasu na 1 l w/w pożywki (3) wpływał korzystnie zarówno na silny wzrost systemu korzeniowego, jak i części zielonych hodowlanych zarodków (7).

Odczyn w pożywce wodnej starano się utrzymać w granicach od 6,5 do 7 pH. Przy zastosowaniu tego rodzaju hodowli można było hodować te rośliny do kwitnienia, nie zdołano jednak doprowadzić ich do pełnej dojrzałości.

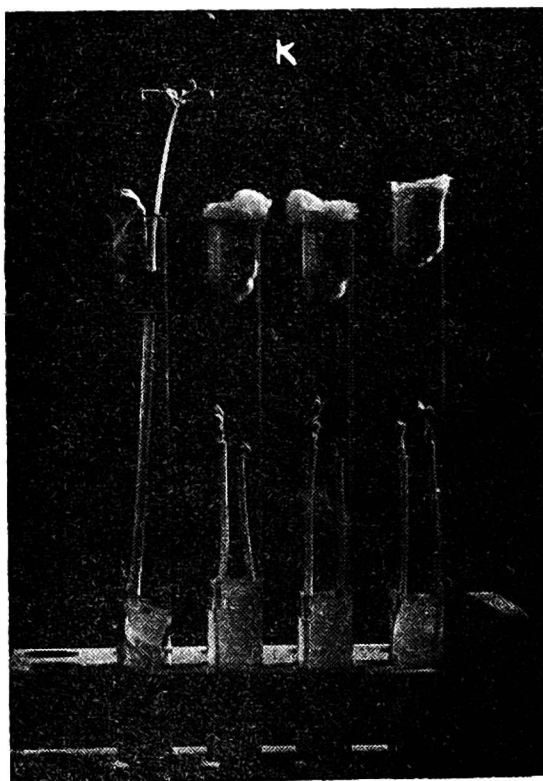
Trzecim sposobem hodowli zarodków było prowadzenie ich w warunkach aseptycznych, w środowisku płynnym, zestalonym agarem w ilości 0,8%. Okres hodowli w warunkach aseptycznych trwał przeciętnie 4 tygodnie, tj. do czasu wytworzenia przez roślinę dwu par liści i odpowiedniego systemu korzeniowego (rys. 4, 5, 6). Po tym okresie młode siewki wysadzano już do gleby (rys. 7, 8, 9 i 10).

Łubin biały (*Lupinus albus*)

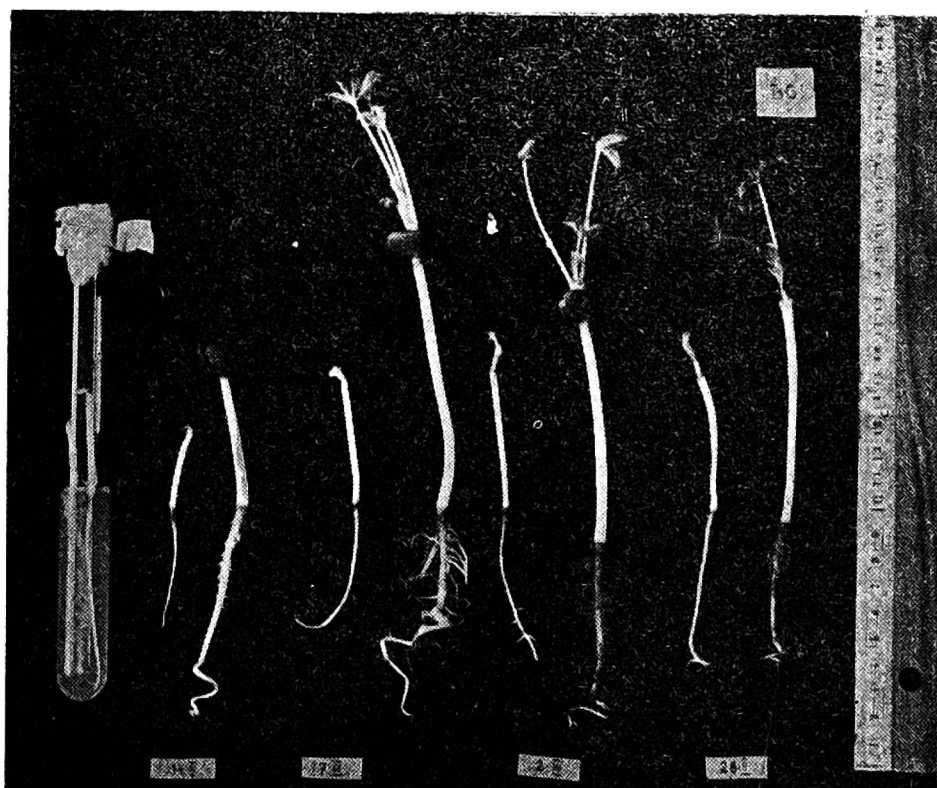
B. Zarodki hodowane w pierwszej fazie w warunkach aseptycznych — w probówkach
 a — rośliny z izolowanych zarodków
 b — rośliny kontrolne



Rys. 4. Zarodki po wyizolowaniu ich z nasion



Rys. 5. Łubin biały słodki. Widok ogólny zarodków rozwijających się w probówkach. (Rośliny 2 tyg.)

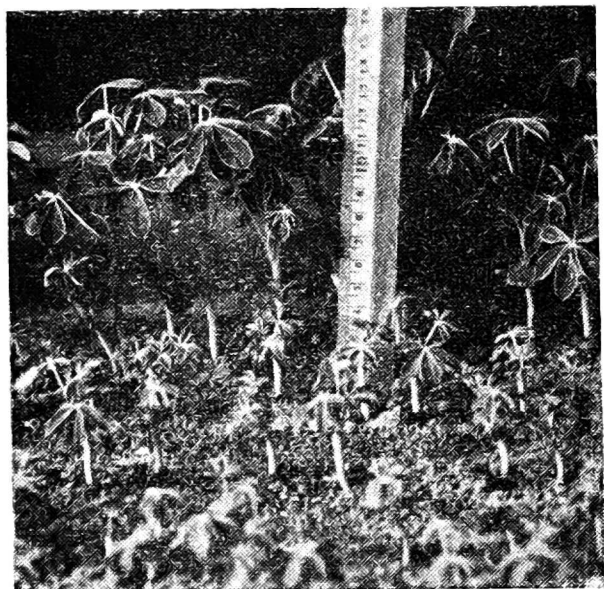


Rys. 6. Łubin biały gorzki. Roślinki w różnych fazach wzrostu

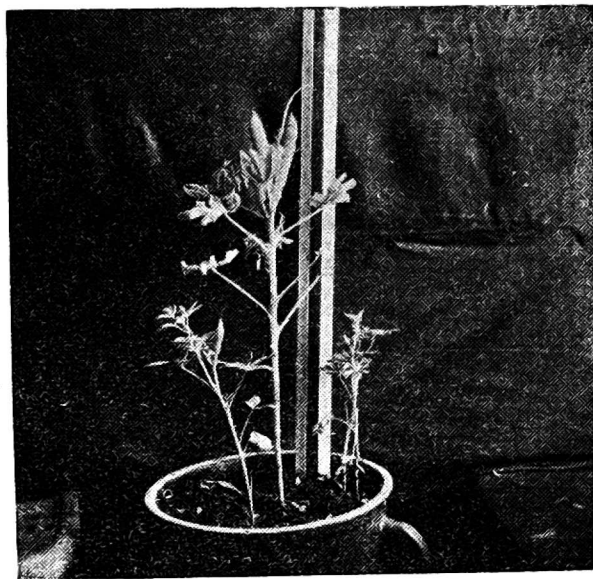
- 1 tygodniowe (14. III)
- 2 „ (7. III)
- 3 „ (2. III i 28. II)

Łubin biały (*Lupinus albus*)

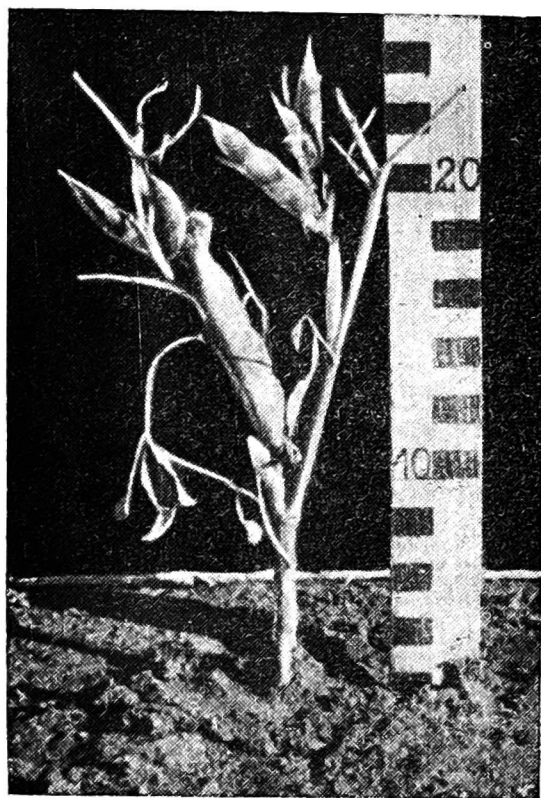
C. Młode roślinki po przeniesieniu ich z warunków sterylnych do zwykłych — glebowych, polowych i wazonowych



Rys. 7. Roślinki w początkowej fazie wzrostu



Rys. 8. Rośliny w okresie wiązania strąków



Rys. 9. Rośliny z izolowanych zarodków w okresie dojrzałości. W stosunku do kontrolnych są one drobne i niskie z charakterystycznym niskim osadzeniem strąków



Rys. 10. Rośliny kontrolne w okresie dojrzałości

Przed wysadzeniem roślin do gleby stosowano niejednokrotnie przejściowo przez 8 do 14 dni środowisko płynne, które dawało możliwość młodym roślinkom wytworzenia nowych korzeni i włóśników, co ułatwiało późniejsze przyjęcie się roślin w glebie.

Sterylizację nasion przeprowadzano w alkoholu i sublimacie, lub 8% podchlorynie wapna. Pomieszczenie, w którym przeprowadzano izolowanie i hodowlę zarodków wyjaławiano ozonem, za pomocą lampy kwarcowej lub rozpylonego w powietrzu alkoholu. Sterylizowanie pomieszczenia rozpylonym alkoholem dawało w naszych badaniach lepsze rezultaty aniżeli użycie lampy kwarcowej.

W hodowli zarodków w sztucznych warunkach aseptycznych stosowano inną pożywkę dla zarodków dojrzałych, a inną dla zarodków niedojrzałych. Skład pożywki dla zarodków dojrzałych na 1 litr wody destylowanej był następujący:

KNO ₃	— 0,5 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	— 0,1 g
Ca(NO ₃) ₂	— 0,1 g
MgSO ₄	— 0,1 g
KCl	— 0,1 g
3 ml 1% cytrynianu żelaza	
30 g sacharozy w postaci cukru	
3—5 ml hydrolizatu kazeiny	

Dodatek sacharozy do pożywki stanowił dla zarodków nie posiadających jeszcze własnego aparatu liściowego źródło węgla, hydrolizat zaś kazeiny — był dla nich źródłem wszystkich niezbędnych aminokwasów.

Jako substancji wzrostowych używano kwasu β -naftoksyoctowego w ilości 0,1 mg na 1 l, lub soli sodowej kwasu α -naftylooctowego w tej samej ilości. Pożywkę zestalano agarem w ilości 8 g na 1 l.

W wypadku hodowli zarodków niedojrzałych ilości składników mineralnych w pożywce zmniejszono o 50%, podwyższając w zamian ilość składników organicznych. Skład więc pożywki dla zarodków niedojrzałych był następujący:

KNO ₃	— 0,25 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	— 0,05 g
Ca(NO ₃) ₂	— 0,10 g
MgSO ₄	— 0,10 g
KCl	— 0,05 g
3 ml 1% cytrynianu żelaza	
60 g sacharozy w postaci cukru	
3—5 ml hydrolizatu kazeiny	
50 ml ekstraktu z kiełkujących nasion	

Do pożywki dla zarodników roślin motylkowych dodawano ekstrakt z kiełkujących nasion soi lub soczewicy. W okresie letnim stosowano również wyciąg z nasion nie dojrziałych zebranych w stadium dojrzałości woskowej.

Dodatek ekstraktu z kiełkujących nasion lub nasion zebranych w stadium dojrzałości woskowej dla dalszego rozwoju i wzrostu zarodków niedojrzałych był konieczny. Zawarte w nim bowiem związki jak auksyny, witaminy oraz inne substancje typu embrionalnego i enzymatycznego warunkowały dalszy rozwój zarodków poza środowiskiem roślinnym.

Ekstrakt z kiełkujących nasion wyjaławiano na zimno, za pomocą specjalnych filtrów, sporządzonych z mikrocelulozy w odpowiednim stosunku z innymi składnikami (7 g mikrocelulozy, 65 ml acetonu, 35 ml eteru etylowego oraz 55 ml alkoholu izoamyłowego). Filtry te wkładano do metalowych sączków i przy pomocy pompy próżniowej wyjaławiano ekstrakt, bez konieczności sterylizowania go w autoklawie.

Mikroelementów do pożywki nie dodawano, ponieważ w wypadku hodowli zarodków roślin strączkowych, korzystnego ich działania nie stwierdzono.

Jako źródło węgla dla zarodków, niezdolnych w pierwszym okresie do asymilacji CO₂, dostarczano sacharozę. Z przebadanych 4 cukrowców jak: glukoza, fruktoza, maltoza i sacharoza, najlepszym okazała się sacharoza, w ilości 3% dla zarodków dojrzałych, 6% dla zarodków niedojrzałych. Reakcja badanych gatunków roślin strączkowych na różne cukrowce była różna. Ogólnie stwierdzono, że zarodki niedojrzałe, wyizolowane we wcześniejszych fazach ich rozwoju wymagają wyższej koncentracji cukrowca w roztworze, aniżeli zarodki dojrzałe. Reakcja niedojrzałych zarodków na wyższe stężenia sacharozy w roztworze pożywki zaznacza się silniejszym wzrostem korzeni i hypokotyła, słabiej zaś epikotyła. Koncentracja 3% sacharozy w pożywce dla zarodków dojrzałych okazała się dla dobrego ich wzrostu i rozwoju w pierwszym okresie optymalną, działając korzystnie na wzrost zarówno korzeni, jak i części pod- i nadliściennych zarodków (5).

Co do azotu jako źródła białka dla zarodków, to stwierdzono w kilku doświadczeniach, że azot nieorganiczny, będący w pożywce w postaci azotanów jest wystarczającym źródłem do budowy białek dla zarodków dojrzałych, — dla zarodków niedojrzałych jest niewystarczający i dlatego dodatek niewielkich ilości aminokwasów (od 1—10 mg na 1 litr pożywki) jest konieczny (6). Ze stosowanych różnych aminokwasów jak asparagina, arginina, biotyna, glutyna i tianina w ilości od 1 do 10 mg/l

pożywki najlepszymi okazały się tianina i glutamina w ilości 5 mg/l roztworu. Dodatek tych aminokwasów do pożywki dla zarodków dojrzałych nie wpływał na lepszy ich wzrost i rozwój — w niektórych tylko wypadkach na przykład u łubinu żółtego na nieco intensywniejsze zabarwienie chlorofilem hypokotyla i pierwszych listków. Dość dobrym źródłem azotu organicznego okazał się dodatek do pożywki hydrolizatu kazeiny (11) w ilości 3 ml dla zarodków dojrzałych i 5 ml dla zarodków niedojrzałych. Hydrolizat kazeiny, (który jak wykazują badania jest mieszaniną ca 20 aminokwasów) służył zarodkom nie tylko jako źródło azotu organicznego, lecz także swoimi właściwościami fizycznymi i swym składem działał w pożywce osmotyzująco.

Dla zarodków niedojrzałych dla ich normalnego rozwoju oprócz w/w substancji organicznych i nieorganicznych konieczny okazał się dodatek wyciągu z kiełkujących nasion (10). Dla zarodków roślin strączkowych najlepszymi ekstraktami okazały się — ekstrakt soczewicy i soi.

Oдноśnie działania czynników fizycznych jak: światło, pH i ciśnienie osmotyczne na wzrost i rozwój zarodków w warunkach sztucznej hodowli, to stwierdzono, że czynniki te obok składu pożywki odgrywają decydującą rolę. Co do warunków świetlnych to stwierdzono, że zarodki dojrzałe jak i niedojrzałe w początkowych okresach hodowli rosną i rozwijają się lepiej w ciemności, aniżeli na świetle. Kilkudniowe przebywanie zarodków dojrzałych w ciemności, powoduje szybszy wzrost korzeni, co w następstwie ma wpływ na intensywniejsze pobieranie pokarmu z pożywki. Dłuższe przetrzymywanie w ciemności zarodków niedojrzałych w początkowym okresie jest konieczne ze względu na ich dalszy stopniowy rozwój embrionalny.

We wzroście poszczególnych części zarodka badanych roślin strączkowych w szczególności zaś łubinu występowała zawsze pewna zależność między wzrostem korzenia głównego i epikotyli z jednej strony, a wzrostem korzeni bocznych i hipokotyli z drugiej strony. Zależność ta jest jednak inna na świetle niż w ciemności. Przyrost korzeni i hipokotyli na świetle odbywał się najintensywniej pod koniec drugiego tygodnia, wzrost zaś epikotyli zaczynał się w tygodniu trzecim. U zarodków hodowanych w ciemności najintensywniejszy przyrost korzenia głównego i hipokotyli zaznaczył się już pod koniec pierwszego tygodnia. Z obserwacji, jak i pomiarów biometrycznych nad tempem wzrostu hipokotyli w pierwszej fazie hodowli, a rytmem wzrostu łodygi w okresie wegetacji stwierdzono, że istnieje między nimi wyraźna współzależność. Wszystkie formy łubinu odznaczające się w pierwszych dniach hodowli szybkim rytmem wzrostu hipokotyli były w okresie późniejszym, w czasie wegetacji — szybkoepędnymi. Współzależność tę stwierdzono u łubinu

Tabela 1
Przyrosty dobowe poszczególnych części zarodków hodowanych w sztucznych warunkach w zależności od różnych warunków oświetlenia. Średnia z pomiarów z 10 zarodków w mm, po 14 dniach hodowli

Lp.	Gatunek	Przyrosty na świetle w mm					Przyrost w ciemni w mm						
		ko- rzenie	średnie przyrosty dobowe	hypo- kotyli	średnie przyrosty dobowe	epiko- tyli	średnie przyrosty dobowe	ko- rzenie	średnie przyrosty dobowe	hypo- kotyli	średnie przyrosty dobowe	epiko- tyli	średnie przyrosty dobowe
1	Łubin żółty słodki	11	0,8	15	1,1	14	1,0	13	0,9	25	1,8	10	0,7
2	Łubin żółty gorzki	14	1,0	20	1,4	17	1,2	18	1,3	32	2,3	13	0,9
3	Łubin biały słodki	17	1,2	22	1,6	20	1,4	21	1,5	35	2,5	15	1,1
4	Łubin biały gorzki	21	1,5	27	1,9	21	1,5	25	1,8	39	2,8	17	1,2
5	Łubin wąskolistny słodki	8	0,6	28	2,0	22	1,6	13	0,9	39	2,8	20	1,4
6	Łubin wąskolistny gorzki	11	0,8	32	2,3	25	1,8	17	1,2	42	3,0	21	1,5
7	Peluszka	28	2,0	—	—	25	1,8	32	2,3	—	—	35	2,5
8	Wyka jara	22	1,6	—	—	20	1,4	25	1,8	—	—	29	2,1
9	Bobik	8	0,6	—	—	11	0,8	11	0,8	—	—	20	1,4

wąskolistnego i żółtego. Należy więc przypuszczać, że na podstawie tempa wzrostu hypokotyli na świetle już w okresie pierwszych dwóch tygodni będzie można stwierdzić, czy ma się do czynienia z formami szybko- i wolnorosnącymi. Miałoby to znaczenie w pracach hodowlanych nad przeprowadzeniem analizy populacji co do szybkości badanych form łubinu, jak i ewentualnego dalszego wykorzystania ich w pracach hodowlanych (tab. 1).

Ważnym czynnikiem w hodowli izolowanych zarodków *in vitro* jest odczyn pożywki, który w miarę wzrostu zarodków, jak i działania innych czynników zewnętrznych ulega częściowej i stałej zmianie. Wprowadzony celowo do pożywki $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ działał buforyzująco. Odczyn pożywki dla zarodków dojrzałych utrzymywano w granicach niższych od 6 do 6,5 pH, dla zarodków zaś niedojrzałych w granicach od 6,5 do 7 pH.

Ciśnienie osmotyczne w pożywce, zwłaszcza dla zarodków niedojrzałych odgrywa niemniejszą rolę niż pH. Czynnikiem działającym silnie osmotyzująco w pożywce były stosowane sacharoza, hydrolizat kazeiny oraz jony KCl — wprowadzone celowo do składu pożywki.

Ze stosowanych w hodowli *in vitro* 3 środowisk — środowisko glebowe posiada najmniejsze znaczenie. Środowisko płynne, zwłaszcza dla zarodków niedojrzałych w pierwszej fazie ich rozwoju odgrywa dużą rolę i to z kilku względów:

- 1) można w nim jako środowisku ściśle zdefiniowanym odpowiednio regulować czynniki fizyczne — jak temperatura, pH, oświetlenie, ciśnienie osmotyczne, co w badaniach tego rodzaju ma duże znaczenie,
- 2) pozwala ono na mierzenie w każdym czasie rytmu wzrostu poszczególnych części zarodka,
- 3) substancje odżywcze będące w środowisku płynnym łatwiej i szybciej mogą być pobrane przez zarodek, niż z jakiegokolwiek innego środowiska.

Najszerze zastosowanie w hodowli zarodków *in vitro* posiada jednak środowisko płynne zestalone agarą. Środowisko to stanowi jakby bazę, w której odbywa się wzrost i rozwój zarodków aż do okresu wykształcenia przez nie własnych korzeni i aparatu liściowego.

Należy zaznaczyć, że prace, jakie przeprowadzono nad opracowaniem metodyki hodowli izolowanych zarodków w sztucznych warunkach nad roślinami strączkowymi mają głównie aspekt hodowlany. Dotychczas bowiem stosowane metody w hodowli roślin nie rozwiązywały jeszcze szeregu zagadnień, które w mniejszym czy większym stopniu ograniczały możliwość otrzymywania nowych form roślinnych. Zastosowanie zaś

metody hodowli izolowanych zarodków w sztucznych warunkach w odniesieniu do hodowli roślin może stać się odskocznią do dalszych osiągnięć i nowych kierunków badań. Dotychczasowa metodyka hodowli zarodków, zwłaszcza niedojrzałych ma jeszcze szereg luk i niejasności. Ze względu więc na to, do dalszych prac nad jej udoskonaleniem winno się przystąpić kompleksowo w oparciu o współczesne metody badawcze, ażeby uczynić z niej skuteczne narzędzie w rękach biologa i hodowcy.

LITERATURA

1. Czosnowski J. — Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek *Vitis ovinifera*. Poznańskie Tow. Przyj. Nauk. Prace Kom. Biol. XIV p. 180—208.
2. Czajkowska-Hoffmanowa A. — O hodowli zarodków roślinnych *in vitro*. Pozn. Tow. Przyj. Nauk. Prace. Kom. Biol. 1956 r.
3. Rappaport J. — In vitro culture of plant embryos and factors controlling their growth. The Botanical Review. v. XX, April 1954 nr 4.
4. Rijven A. H. G. C. 1952 — In vitro studies on the embryo of *Capsella bursa pastoris*. Act. Bot. Neerl. I. 157.
5. Sanders M. E., Burkhold P. R., 1948. — Influence of amino acids on growth of *Datura* embryos culture, Proc. Nat. Acad. Sci., 34, 514—526.
6. Spoerl E. 1948. — Amino acids as sources of nitrogen for archid embryos, Amer. Journ. Bot., 35, 38—95.
7. Tomaszewski Z. — Działanie humianu potasu na rozwój kilkunastu gatunków roślin w kulturach wodnych i wazonowych (w rękopis'e).
8. Tukey A. B. 1938. — Growth patterns of plants developed from immature embryos on artificial culture. Bot. Gaz., 99, 630—665.
9. White P. R. A. — Handbook of Plant Tissues Culture Pp I — 277. Roland Press Company, New Jork. 1943.
10. Van Overbeck J., Conhlin M. E., Blakeslee A. F. 1942. — Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. Amer. Journ. Bot. 29, 472—477.
11. Ziebur N. K., Brink R. A., Graf L. H., Stahman M. H. — The effect of casein hydrolisate on the growth in vitro of immature *Hordeum* embryos 1950, „Amer. Journ. Bot.” 37: 144.

PRELIMINARY INVESTIGATIONS ON THE CULTURE OF ISOLATED EMBRYOS OF LEGUMINOUS PLANTS UNDER ARTIFICIAL CONDITIONS

Z. Tomaszewski

S u m m a r y

Investigations on the culture in vitro of isolated embryos were carried on during five years 1953—1957. Mature and immature embryos were cultured. The first period of investigations concerned the culture

of mature embryos i.e. embryos capable of germination after their separation from the seed. The culture of immature embryos entered the second stage of investigations, after a suitable procedure had already been elaborated. Immature embryos were isolated either directly from the ovary or from pods at different stages of development directly after pod-set.

The experimental material consisted of embryos of different species and varieties of leguminous plants such as: both the bitter and the fodder forms of *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius*, the gray pea (*Pisum sativum*), spring vetch, soybean, lentils, the bean (*Vicia faba L. minor*) and *Lathyrus tingitanus*.

Three types of media were used: soil, liquid and liquid medium set with agar. The liquid medium proved particularly suitable for immature embryos while the agar-hardened medium was found to be better for older embryos.

The nutrient media contained different proportions of organic and inorganic constituents depending upon whether they were to be used for mature or immature embryo culture. The constituents per litre distilled water are given below:

Nutrient Medium Composition

	For mature embryos	For immature embryos
KNO ₃	0,5 g	0,25 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,1 g	0,05 g
Ca(NO ₂) ₂	0,1 g	0,10 g
MgSO ₄	0,1 g	0,10 g
KCl	0,1 g	0,05 g
Potassium salt of humic acid	0,1 g	0,05 g
Iron citrate 1% solution	3 ml	3 ml
Saccharose as sugar	30 g	60 g
Agar	8 g	5 g
Casein hydrolizate	—	3—5 ml
Germinating seed extract	—	50—100 ml

For mature embryos the solution was kept at a pH of 6,0—6,5 and for immature ones at a pH of 6,5—7,0.

The embryos were cultured under sterile conditions until they had developed an adequate number of roots and the leaf apparatus. They were then transplanted into the soil. Growth and development of the transplanted plants was slow and weak at first. A while later however plants developed normally and produced seeds.

ВСТУПИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЫРАЩИВАНИЮ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

З. Томашевски

Содержание

В течение пяти лет, с 1953 по 1957 гг. велись исследования по выращиванию изолированных зародышей *in vitro*. Работали с зародышами зрелыми и незрелыми. Выращиванием зрелых, т. е. таких зародышей, которые после их изолирования от семени были способны к прорастанию, занимались в начальном периоде исследований. Выращиванием незрелых зародышей занимались после выработки соответствующего метода. Незрелые зародыши изолировали из завязи или из только что завязавшихся бобов — на разных фазах их развития.

Подопытный материал составляли зародыши разных видов и сортов бобовых растений, а именно: жёлтый люпин, белый люпин, синий люпин, их кормовые и высокоалкалоидные формы, пелюшка, яровая вика, соя, чечевица, бобы и чина.

Исследования проводили на трёх средах: почве, жидкой и агаризованной. Самой лучшей оказалась жидкая среда, особенно для еще незрелых зародышей и агаризованная для старших зародышей.

Применяемые питательные среды имели в своем составе анорганические и органические элементы в разных количественных отношениях в зависимости от того, предназначены ли были для выращивания зрелых или незрелых зародышей. Количество отдельных элементов в 1 л дистиллированной воды было следующее:

	для зрелых зародышей	для незрелых зародышей
KNO ₃	0,5 г	0,25 г
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,1 г	0,05 г
Ca(NO ₃) ₂	0,1 г	0,10 г
MgSO ₄	0,1 г	0,10 г
HCl	0,1 г	0,05 г
гумян калия	0,1 г	0,05 г
лимоний железа — 1% раствор	3 см ³	3 см ³
сахароз в виде сахара	30 г	60 г
агар-агар	8 г	5 г
гидролизат казеина	—	3—5 см ³
экстракт из прорастающих семян	—	50—100 см ³

Реакцию питательной смеси для зрелых зародышей удерживали в пределах рН 6,0 до 6,5, для незрелых зародышей в пределах рН 6,5 до 7,0.

В асептических условиях зародыши выращивались до момента образования соответствующего количества корней и листового аппарата, затем пересаживались в почву. Рост и развитие этих растений первоначально были медленные и слабые, в дальнейшем они развивались нормально и давали семена.