

VÝVOJ SOMATICKÝCH EMBRYÍ CHLUMNÍHO EKOTYPU SMRKU ZTEPILÉHO V SOUVISLOSTI SE ZMĚNAMI ENDOGENNÍHO OBSAHU SPERMIDINU, PUTRESCINU A SPERMINU

DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE HURST ECOTYPE IN CONNECTION WITH CONTENT CHANGES OF SPERMIDINE, PUTRESCINE AND SPERMINE

HELENA CVRČKOVÁ¹ - JANA MALÁ¹ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ¹ - MILENA CVIKROVÁ²

¹Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

²Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a powerful tool for improvement of forest trees and is considered to be the *in vitro* plant propagation system for conifers. The process of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) can be divided into periods characterized by the different degree of embryonic tissue differentiation. Contents of free polyamines: putrescine, spermidine and spermine were determined in different developmental stages of hurst ecotype of Norway spruce (*Picea abies* [L.] KARST.) somatic embryos: after 4 weeks of the growth of the embryogenic tissue on proliferation medium, after 2 and 5 weeks of the culturing on maturation medium, after 1 and 2 weeks in the course of desiccation phase. Maturation of somatic embryos was accompanied by increase of concentration of polyamines. Ivory-coloured torpedo stage embryos after 5 weeks on maturation medium with not yet well developed cotyledons contained the highest level of spermidine. Two weeks after desiccation the concentration of spermidine and putrescine decreased, whereas the content of spermine significantly increased. During the desiccation phase the radicles of embryos with well-developed cotyledons started changing its colour to the red. Mainly these embryos converted into plantlets. To improve the efficiency of somatic embryogenesis of less responsive genotypes the potential application of polyamines into the growth medium is discussed.

Klíčová slova: somatická embryogeneze, smrk ztepilý, spermidin, putrescin, spermin

Key words: somatic embryogenesis, Norway spruce, spermidine, putrescine, spermine

ÚVOD

Metoda somatické embryogeneze představuje efektivní způsob mikropropagace lesních dřevin vhodný zejména pro jehličnany. HACCUS (1978) definoval somatickou embryogenezi jako proces vytváření bipolárního embrya ze somatického pletiva. Somatická embrya podobně jako zygotická jsou samostatným objektem vznikajícím z jedné buňky a nemají společné cévní svazky s mateřským pletivem. Další *in vitro* vývin somatického embrya se velmi podobá zygotické embryogenezi (PIERIK 1987). Při nastavení optimálních kultivačních podmínek, kdy je v explantátových kulturách odstraněn vliv fyziologických procesů celistvé rostliny, dochází k násobnému zvýšení počtu embryí (PROCHÁZKA et al. 1998). K hromadnému namnožení klonů jehličnatých dřevin je možné užít systém bioreaktoru, kdy v kontrolovaných podmínkách lze získat na litr tekutého média několik tisíc embryí (PILATE et al. 2002).

Somatická embryogeneze představuje perspektivní metodu reprodukce obzvláště pro smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) KARST.), (BOENMAN 1985, HAKMAN et al. 1985, ATTREE et FOWKE 1993, CHALUPA 1985, CHALUPA et al. 1990, MALÁ 1991), kdy se podařilo somatická embrya zregenerovat v kompletní rostliny. Proces somatické embryogeneze probíhá v několika vývojových stadiích charakterizovaných rozdílným stupněm embryogenní diferenciace: indukce embryogenního pletiva, proliferace embryogenních kultur, zrání zakončené konverzí vyvinutých somatických embryí v kompletní rostliny. Širšímu uplatnění somatické embryogeneze v praxi však

brání nízké procento přežívajících rostlin vyklíčených ze somatických embryí (ATTREE, FOWKE 1993).

Embryogenní pletivo je indukováno především působením fytohormonů na zralá nebo nezralá zygotická embrya. CHALUPA (1985) uvádí, že zakládání embryogenních kultur z nezralých zygotických embryí iniciuje vyšší podíl embryogenního pletiva, stanovit však optimální zralost šišek není jednoduché. Indukce a navazující proliferací fáze vyžadují z fytohormonů auxiny a cytokininy, k navození zrání somatických embryí se využívá kyselina abscisová (ATTREE et al. 1991). Vývoj embryí a jejich konverze v kompletní výpěstky je ovlivňován nejen koncentrací a vzájemnými poměry růstových látek dodaných do kultivačního média, ale též obsahem endogenních fytohormonů. Změny obsahu endogenních hormonů (indolyl-3-octové kyseliny, abscisové kyseliny a etylenu) v průběhu vývoje somatických embryí u smrku sledoval VÁGNER et al. (2005). Bylo zjištěno, že kromě klíčové role auxinů a cytokininů hrají velmi důležitou funkci při diferenciálním procesu také polyaminy. Jedná se o látky s růstově regulační aktivitou, významné pro normální buněčný růst, které se uplatňují i v regulaci somatické a zygotické embryogeneze (KONG et al. 1998, SILVEIRA et al. 2004). Polyaminy se účastní širokého spektra fyziologických pochodů spojených s buněčným dělením, růstem a diferenciací rostlinných pletiv. Nejdůležitější polyaminy vyskytující se v rostlinách jsou putrescin, spermidin a spermin.

O mechanismu účinku polyaminů na somatickou embryogenezi u smrku ztepilého není zatím příliš mnoho známo. Výchozím rost-

Tab. 1.

Obsah putrescinu, spermidinu a sperminu v embryogenních kulturách smrku ztepilého kultivovaných 4 týdny na proliferačním médiu, 2 týdny na maturačním médiu, u zralých somatických embryí po 5 týdnech na maturačním médiu a ve vyvinutých embryích po 1 a 2 týdenní desikaci. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka ze tří opakování.

Contents of putrescine, spermidine and spermine in Norway spruce embryogenic culture growing 4 weeks on proliferation medium, 2 weeks on maturation medium, in mature somatic embryos after 5 weeks on maturation medium and in embryos in the course of desiccation (after 1 and 2 weeks). Mean values \pm SD of 3 replicates are presented.

Polyaminy/Polyamines	Putrescin/Putrescine	Spermidin/Spermidine	Spermin/Spermine
	nmol.g ⁻¹ suché hmoty/ nmol.g ⁻¹ dry matter	nmol.g ⁻¹ suché hmoty/ nmol.g ⁻¹ dry matter	nmol.g ⁻¹ suché hmoty/ nmol.g ⁻¹ dry matter
Embryogenní kultura po 4 týdnech na proliferačním médiu/ Embryogenic culture, proliferation medium 4 weeks	1 234,4 \pm 112,2	1 361,7 \pm 139,5	302,3 \pm 26,5
Embryogenní kultura po 2 týdnech na maturačním médiu/ Embryogenic culture, maturation medium 2 weeks	1 850,5 \pm 185,2	2 096,4 \pm 199,3	392,4 \pm 40,1
Zralá somatická embrya po 5 týdnech na maturačním médiu/ Mature embryos, maturation medium 5 weeks	2 831,7 \pm 254,4	4 406,9 \pm 450,2	833,7 \pm 79,5
Zralá embrya po 1 týdnu desikace/ Mature embryos, desiccation 1 week	780,1 \pm 70,8	2 473,1 \pm 248,0	631,6 \pm 57,5
Zralá embrya po 2 týdnech desikace/ Mature embryos, desiccation 2 weeks	520,5 \pm 48,3	1 972,5 \pm 188,4	1 455,5 \pm 135,2

linným materiálem této studie byly embryogenní kultury založené z geneticky cenných jedinců chlumního ekotypu smrku ztepilého. V průběhu vývoje somatických embryí byly sledovány endogenní obsahy spermidinu, putrescinu a sperminu. Zjištěné poznatky o koncentracích sledovaných polyaminů v korelaci s vývojovými stadii embryí bude možné využít ke zefektivnění metody somatické embryogeneze u méně responsibilních klonů smrku ztepilého.

MATERIÁL A METODIKA

Indukce a proliferace somatické embryogeneze

Pro získání výchozího rostlinného materiálu byly sklizeny v polovině července nezralé šišky, rostoucí ve vrcholových partiích vybraných jedinců (vysokých kolem 40 - 50 m, přes 120 let starých) chlumního ekotypu smrku ztepilého v CHKO Labské pískovce a NP České Švýcarsko. Ve výběru donorových jedinců převažovaly rodičovské stromy. Sběr se uskutečnil na několika lokalitách, aby se dosáhlo založení sbírky embryogenních linií s větší genetikou variabilitou. Šišky byly skladovány při 4 °C a postupně zpracovány. Vyluštěná semena byla sterilizována v 1% roztoku NaClO (Savo, Bochemie ČR). Z nezralých semen byla extirpována zygotická embrya, která byla pro odvození embryogenních linií posazena na modifikované médium E (MALÁ et al. 1995). Základní komponenty (makroelementy, mikroelementy, vitamíny) byly převzaty z média GD (GUPTA, DURZAN 1986), k nim byly přidány cytokininy BAP (6-benzylaminopurin) 0,5 mg.l⁻¹, kinetin 0,5 mg.l⁻¹, auxin 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetvá) 1,0 mg.l⁻¹ a médium bylo zpevněno gelritem 2 g.l⁻¹ (gelrit i hormony od Sigma, Chemical Co.), pH bylo upraveno na 5,8. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách ve tmě při teplotě 24 °C. Odvozené rostoucí embryogenní linie byly evidovány jako jednotlivé genotypy a byly pasážovány každé 4 týdny na čerstvé médium stejného složení za účelem namnožení embryogenních kultur.

Zrání somatických embryí

Za účelem získat zralá somatická embrya byly responsibilní embryogenní linie postupně přeneseny na maturační médium. Maturation probíhala na médiu E, ale pro navození konverze byly hormony použité v médiu pro indukci a proliferaci nahrazeny kyselinou abscisovou 8 mg.l⁻¹ (Sigma, Chemical Co.) a také byl přidán polyetylen glykol 20 g.l⁻¹ (Sigma, Chemical Co.). Roztok kyseliny abscisové byl vysterilizován filtrační přes membránový filtr (Anotop 10 Plus, Whatman) a přidán k ostatním složkám média až po jejich vyautoklavování. Kultury byly kultivovány ve stejných kultivačních podmínkách jako při předchozích fázích somatické embryogeneze a po týdnu přesazeny na čerstvé médium. Po 2 týdnech byly embryogenní kultury přesazeny na modifikované E médium obsahující auxin kyselinu indolyl-3-máselnou 0,1 mg.l⁻¹ (Sigma, Chemical Co.) a opět bylo přidáno 20 g.l⁻¹ polyetylen glykolu. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 μ mol.m⁻².s⁻¹. Po 3 týdnech byla somatická embrya pro dokončení konverze vystavena desikaci.

Desikace

Embryogenní kultury s vyvinutými somatickými embryi byly kultivovány 1 týden ve tmě při nízké teplotě (4 °C). Pak byla somatická embrya oddělena od embryogenního suspenzorového pletiva a opatrně přemístěna do otevřených Petriho misek, které byly vloženy do exsikátoru. Desikace probíhala za postupného snižování vzdušné vlhkosti, které bylo dosaženo pomocí nasycených roztoků: hydrofosforečnanu sodného 95% vlhkost, síranu zinečnatého 90% vlhkost, síranu amonného 81% vlhkost, chlornanu sodného 75% vlhkost. Exsikátory byly umístěny v klimatizované místnosti při teplotě 24 °C a 16hodinové světelné fotoperiodě. Po vyklíčení byla embrya přemístěna do vysterilizovaného jemného perlitu navlhčeného naředěným roztokem MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) v poměru 1 : 10.

Analýzy polyaminů

Embryogenní pletiva a somatická embrya byla odebírána pro analýzy v pěti intervalech jejich vývoje: po čtyřech týdnech kultivace na proliferačním médiu, po dvou a pěti týdnech kultivace na maturačním médiu, po jedno a dvoutýdenní desikaci. Odebrané vzorky (200 mg čerstvé hmoty) byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a do zpracování uloženy v hluboko mrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při zpracování byla rostlinná pletiva rozdrcena pomocí tekutého dusíku a přes noc extrahována při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, v 5% roztoku kyseliny chloristé (na 100 mg pletiva 1 ml 5% kyseliny chloristé). Jako interní standard byl přidán 1,7-diaminoheptan. Extrakty byly centrifugovány 15 min. při 21 000 g. Hladiny polyaminů - putrescinu, spermidinu, sperminu - byly stanovovány pomocí metody HPLC (High Performance Liquid Chromatography) podle autorů SLOCUM et al. (1989) v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. Zjištěné hodnoty polyaminů jsou uvedeny v tabulce a vyjádřeny v $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty embryogenního pletiva.

Statistická analýza

Pro získání dat byly uskutečněny dva nezávislé experimenty, jejichž výsledky byly analogické. Vypočítané průměry a směrodatné odchylky ze tří opakování od každého experimentu jsou uvedeny v tabulce 1. Pro statistickou analýzu zjištěných hodnot obsahu polyaminů byl použit Student t-test.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Metodou HPLC byly stanoveny hladiny sledovaných polyaminů - putrescinu, spermidinu, sperminu v různých fázích vývoje embryogenní kultury (tab. 1). Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny v $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty embryogenního pletiva. V proliferační fázi embryogenní pletivo obsahovalo přibližně stejnou hladinu putrescinu a spermidinu, obsah sperminu byl podstatně nižší. Na maturačním médiu došlo již po 2týdenní kultivaci k výraznému navýšení obsahu putrescinu a spermidinu, obsah sperminu se navýšil mírně, v embryogenní kultuře se formovala globulární a částečně polarizovaná embrya. Podstatné zvýšení obsahu všech tří polyaminů bylo zjištěno po 5týdenní kultivaci na maturačním médiu. V této fázi byla již embrya oddělena od suspenzorového embryogenního pletiva a obsah spermidinu v nich značně převyšoval nad obsahem putrescinu. Tvarově převažovala embrya torpédovitěho charakteru, slonově zbarvená bez zřetelně vyvinutých kotyledonů (obr. 1). U embryí byl zjištěn 2,3krát vyšší obsah putrescinu, 3,2krát spermidinu a 2,7krát sperminu v porovnání s obsahem těchto látek v embryogenním pletivu v proliferační fázi. Po fázi maturace byla vyvinutá embrya kultivována jednotlivě a byla vystavena desikaci. Analýza obsahu polyaminů po prvním týdnu desikace ukázala významný pokles hladiny všech sledovaných polyaminů. V druhém týdnu pokračoval pokles putrescinu a spermidinu a naopak bylo pozorováno významné zvýšení sperminu, což by mohlo být způsobeno reakcí na stresové podmínky desikace. V průběhu 14denní desikace se u embryí zřetelně vyvinuly kotyledony a radikula, která u vyvíjejících se embryí byla zbarvena do červena (obr. 2) a v kompletní rostlině konvertovala pouze embrya s červeně zbarvenou kořenovou částí.

Sledováním obsahu polyaminů v průběhu somatické embryogeneze se zabývali někteří autoři, např. SILVEIRA et al. (2004) uvádí, že u *Pinus taeda* bylo nejvyšší zastoupení putrescinu, zatímco MINOCHA et al. (1999) u somatických i zygotických embryí *Pinus radiata* zjistil vysokou hladinu spermidinu, pozitivně korelujícího s jejich

vývojem, což bylo potvrzeno v této práci i u somatických embryí *Picea abies*. Rovněž u *Picea rubens* MINOCHA et al. (2004) determinoval u embryogenních kultur ve fázi proliferace a maturace převládající koncentraci spermidinu, avšak u pre-embryogenních kultur převažovala koncentrace putrescinu. Při testování dalších rostlin při vývoji somatických embryí byl u mrkve sledován vysoký obsah spermidinu, který značně převyšoval nad putrescinem ve fázi torpédovitých embryí (MENGOLI et al. 1989). Podobně byl výskyt spermidinu identifikován v průběhu vývoje somatických embryí v kulturách *Vigna aconitifolia* (KAUR-SAWHNEY et al. 1985), *Hevea brasiliensis* (EL HADRAMI, D'AUZAC 1992) a ve stadiu globulárních embryí v kulturách alfalfa (*Medicago sativa*) (CVIKROVÁ et al. 1999).



Obr. 1.

Embrya torpédovitěho charakteru smrku ztepilého, slonově zbarvená, po 5 týdnech kultivace na maturačním médiu
Ivory-coloured torpedo stage embryos of Norway spruce after 5-week cultivation on maturation medium



Obr. 2.

Embrya s červeně zbarvenou radikulou, která se dále vyvíjela v klíčnou rostlinu, po 2 týdnech desikační fáze
The embryos with red coloured radicles which further developed and converted into plantlets after 2 weeks of desiccation phase

ZÁVĚR

V průběhu vývoje somatických embryí smrku ztepilého byly zjištěny pomocí metody HPLC změny v obsahu sledovaných polyaminů a z dosažených výsledků vyplývá, že mění se hladiny polyaminů korelují s vývojovými stadii somatické embryogeneze, od iniciace embryogenního pletiva až po získání klíčících rostlin. Využití metody somatické embryogeneze při množení smrku ztepilého v lesnické praxi brání nedořešené problémy při konverzi somatických embryí zahrnující fáze maturace a klíčení. Výzkum se zaměřuje na studium regulačních růstových látek, které mají základní vliv na průběh somatické embryogeneze. Byla prokázána nezbytnost dodání exogenních fytohormonů pro efektivní somatickou embryogenezi. Dosažené výsledky potvrzují i významnou úlohu polyaminů ve vývoji somatických embryí a exogenně dodávané polyaminy by mohly ovlivňovat a zlepšovat indukci embryogenního pletiva a následný vývoj somatických embryí. KEVERS et al. (2000) potvrdili, že exogenní aplikace spermidinu v iniciační fázi významně zvýšila produkci embryí u kultur *Panax ginseng*. V současnosti se studují možnosti optimalizace metodických postupů somatické embryogeneze u méně responsivních genotypů chlumního ekotypu smrku ztepilého.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru č. MZE0002070203 a výzkumného projektu NAZV č. QH82303.

LITERATURA

- ATTREE S. M., MOORE D., SAWHNEY V. K., FOWKE L. C. 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* [MOENCH.] VOSS.) somatic embryos: effects of a nonplasmolysing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany*, 68: 519-525.
- ATTREE S. M., FOWKE L. C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35: 1-35.
- BOENMAN C. H. 1985. Hormonal control of growth and differentiation in conifer tissues *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 27: 249-256.
- CVIKROVÁ M., BINAROVÁ P., EDER J., VÁGNER M., HRUBCOVÁ M., ZON' J., MACHÁČKOVÁ I. 1999. Effect of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase activity on growth of alfalfa cell suspension culture: alterations in mitotic index, ethylene production, and contents of phenolics, cytokinins, and polyamines. *Physiologia Plantarum*, 107: 329-337.
- EL HADRAMI M. I., D'AUZAC J. 1992. Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plant Physiology*, 140: 33-36.
- GUPTA P. K., DURZAN D. J. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/technology*, 4: 643-645.
- HACCIUS B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus culture. *Phytomorphology*, 28: 74-81.
- HAKMAN I., FOWKE L. C., VON ARNOLD S., ERIKSSON T. 1985. The development of somatic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science*, 38: 53-59.
- CHALUPA V. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* /L./ KARST. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, 14: 65-90.
- CHALUPA V., MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M. 1990. Somatic embryogenesis and regeneration of spruce (*Picea abies* /L./ KARST.) and oak (*Quercus robur* L.). In: *Manipulation in vitro in higher plants. Proceedings Conference Instituti of Experimental Botany, Prague, CSAS, Olomouc*: 98 s.
- KAUR-SAWHNEY R. K., SHEKHAWAT N. S., GALSTON A. W. 1985. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna-acontifolia* and *Avena-sativa*. *Plant Growth Regulation*, 3: 329-337.
- KEVERS C., LE GAL N., MONTEIRO M., DOMMES J., GASPARD T. 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role of polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regulation*, 31: 209-214.
- KONG L., ATTREE S. M., FOWKE L. C. 1998. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Science*, 133: 211-220.
- MALÁ J. 1991. Organogenesis and somatic embryogenesis in Norway spruce. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, 17: 59-72.
- MALÁ J., DUJÍČKOVÁ M., KÁLAL J. 1995. The development of encapsulated somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* /L./ KARST.). *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 18: 59-73.
- MENGOLI M., PISTOCCHI R., BAGNI N. 1989. Effect of long-term treatment of carrot cell-cultures with millimolar concentrations of putrescin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27/1: 1-8.
- MINOCHA R., SMITH D. R., REEVES C., STEELE K. D. MINOCHA S. C. 1999. Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 105: 155-164.
- MINOCHA R., MINOCHA S. C., LONG S. 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* SARG.). *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40: 572-580.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- PIERIK R. L. M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers: 344 s. ISBN 90-247-3531-9.
- PILATE G., PAQUES M., LEPLÉ J.-C., PLOMION C. 2002. Outils et méthodes. Les biotechnologies chez les arbres forestiers. *Revue forestiere francaise*, 54: 161-180.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. 1998. *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha, Academia: 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- SILVEIRA V., FLOH E. I. S., HANDRO W., GUERRA M. P. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular proteins, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 53-60.
- SLOCUM R. D., FLORES H. E., GALSTON A. W., WEINSTEIN L. H. 1989. Improved method for HPLC analysis of polyamines, agmatine and aromatic monoamines in plant tissue. *Plant Physiology*, 89: 512-517.
- VÁGNER M., VONDRÁKOVÁ Z., FISCHEROVÁ L., VIČÁNKOVÁ A., MALBECK J. 2005. Endogenous phytohormones during Norway spruce somatic embryogenesis. In: Libiaková G., Gajdošová A. (eds.): *Proceedings COST 843 and 851 Action, Stará Lesná (28.6.-3.7.)*. Nitra, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS: 162-164.

DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE HURST ECOTYPE IN CONNECTION WITH CONTENT CHANGES OF SPERMIDINE, PUTRESCINE AND SPERMINE

SUMMARY

Embryogenic cultures were established from immature zygotic embryos of hurst ecotype of Norway spruce (*Picea abies* [L.] KARST.) growing in Protected Landscape Area Labské pískovce and The České Švýcarsko National Park. Somatic embryogenesis is considered as an advantageous technique for *in vitro* propagation of conifers. The development of embryos as well as their conversion into complete plantlets is closely associated with changes in endogenous phytohormone levels. Beside the key roles of auxins and cytokinins, very important function in differentiation processes belongs to polyamines. Three commonly polyamines occurring in plants are putrescine, spermidine and spermine. The contents of putrescine, spermidine and spermine at different developmental stages of Norway spruce embryos were determined by means of HPLC. During the growth of the embryogenic culture of Norway spruce on proliferation medium, embryogenic tissue contained approximately equal putrescine and spermidine levels. The content of spermine at this stage was rather low. After 2 weeks of culture on maturing medium, when the culture contained globular and partly polarized embryos, the increase in all three polyamines was observed. Maturation of somatic embryos after 5 weeks was accompanied by increase of concentrations of putrescine (2.3 times), spermidine (3.2 times) and spermine (2.7 times) in comparison with above mentioned polyamines in embryogenic tissue on proliferation medium. At this stage the embryos could be separated from the remaining tissue. Ivory-coloured torpedo stage embryos with not yet well developed cotyledons formed the major part of embryos. In the course of desiccation phase for 2 weeks cotyledons became clearly developed and radicle parts changed their coloration and the embryos became biochemical mature. Only the embryos with red coloured radicle further developed and converted into plantlets. The analyses after 1 week of desiccation showed marked decrease in all three polyamines contents. During the second week of desiccation further decrease in putrescine and spermidine occurred, on the contrary, the level of spermine significantly increased. This increase could be interpreted as a non-specific response to desiccation stress. The studies of the possibility of improving the method of somatic embryogenesis in a less responsive hurst ecotype of Norway spruce by exogenous addition of polyamines are now in progress.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká republika
tel.: 257 892 268; e-mail: cvrckova@vulhm.cz