

Badanie możliwości zwiększenia żywotności i stopnia zapylenia kwiatów gryki zwyczajnej w celu uzyskania wyższego plonu nasion

Kierownik zadania: Prof. dr hab. Agnieszka Płażek, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny UR w Krakowie

Wstęp

Gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum* Moench.) ze względu na podobny skład chemiczny nasion i agrotechnikę uprawy zaliczana jest do grupy roślin zbożowych. Jej nasiona, choć nie zawierają glutenu, odznaczają się dużą zawartością białka i dobrze zbilansowanym składem aminokwasów. Roślina ta posiada liczne zalety, wśród których można wymienić ochronę gleby przed erozją, działanie fitosanitarne, wysoką zdolność przyswajania azotu i fosforu z gleby, odporność na szkodniki i choroby. Gryka jest rośliną owadopylną, w 90% zapylaną przez pszczoły i jest bardzo ceniona za swą miododajność. Największą jej wadą jest bardzo krótka żywotność i zdolność do zapylenia pojedynczego kwiatu, która wynosi zaledwie jeden dzień (Cawoy i in. 2009). Głównymi powodami słabego zawiązywania nasion jest samoniezgodność wynikająca z heterostylii dimorficznej oraz wadliwy rozwój woreczków zalążkowych (Adachi i in. 1983, Björkman i in. 1995, Woo i in. 2001). Gryka jest rośliną ciepłolubną i wrażliwą na najmniejsze przymrozki. Zbyt wysoka temperatura i susza powodują z kolei zamieranie zawiązków (Adachi i in. 1983). Duży wpływ na zapylenie i wiązanie nasion mają warunki pogodowe w czasie kwitnienia – długotrwałe opady deszczu powodują wymywanie nektaru (nektarniki gryki są otwarte), co powoduje, że oblot przez pszczoły jest niewystarczający do zapylenia. Zbyt wysokie temperatury i susze powodują, że znamię słupka szybko zasycha, pyłek lub łagiewka pyłkowa zamierają i nie dochodzi do zapłodnienia, natomiast powstałe już zawiązki nie rozwijają się w nasiona.

Współczesne rolnictwo dopuszcza do użytku szereg biostymulatorów, które nie mają szkodliwego wpływu na środowisko. Ich rola polega na zwiększaniu plonów poprzez wpływ na przebieg procesów fizjologicznych związanych z kwitnieniem, zapłodnieniem, rozwojem owoców i nasion. Ponadto, niektóre z tych substancji podwyższają tolerancję roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe i łagodzą ich negatywny wpływ na rośliny.

Hormony roślinne (auksyny, gibereliny, cytokininy) stymulują proces zapylenia i zawiązywania nasion, natomiast podane na kwiat przed zapyleniem stymulują rozwój owoców partenokarpicznych. Poliaminy są zaliczane do regulatorów wzrostu, a ich rola nie jest do końca poznana. Przypisuje się im jednak wielostronne działanie stymulujące proces kwitnienia oraz udział w reakcji odpornościowej na stresy środowiskowe, zwłaszcza na suszę. Cysteina jest aminokwasem zawierającym aktywną grupę – SH i działa jako antyoksydant, co ma istotne znaczenie biorąc pod uwagę, że każdy stres środowiskowy inicjuje stres oksydacyjny, polegający na powstawaniu reaktywnych form tlenu (RFT).

Z komercyjnych stymulatorów stosowane są często preparaty takie jak ASAHI SL czy TYTANIT, poprawiające wzrost i rozwój roślin, zwiększające także jakość i wysokość plonów. Tytanit korzystnie wpływa na rozwój pyłku, zwiększając ilość kielkujących ziaren pyłku oraz intensyfikuje wzrost łagiewki pyłkowej. W badaniach Żur i współautorów (2003) wykazano, że roztwór chlorku sodu przełamuje samoniezgodność u kapustnych.

Głównym celem badań było poszukiwanie przyczyny słabego plonowania gryki, oraz próby jego poprawienia. Poszczególnymi celami były:

1. Zbadanie biologii kwitnienia dwóch polskich odmian gryki „Kory” i „Pandy”, oraz wykrycie ewentualnych zaburzeń w rozwoju pyłku i woreczka zalążkowego. Cel ten realizowano przeprowadzając analizy mikroskopowe oceniające prawidłowość rozwoju pylników i woreczków zalążkowych.

2. Ocena wpływu ośmiu stymulatorów wzrostu: gibereliny, auksyny, cytokininy, putrescyny (poliamina), cysteiny, ASAHI SL, Tytanitu, oraz roztworu NaCl stosowanych w dwóch fazach kwitnienia na:

- a. rozwój embriologiczny
- b. liczbę kwiatów na roślinie
- c. obfitość nektarowania oraz ilościowy i jakościowy skład nektaru
- d. parametry plonu: liczbę i masę nasion w przeliczeniu na jedną roślinę oraz masę tysiąca nasion.

Cele badań były realizowane w ramach pięciu tematów badawczych.

Temat badawczy 1. Badania pilotażowe prowadzone w warunkach szklarniowych dotyczące siły kiełkowania nasion gryki odmiany „Kora” i „Panda”, oraz optymalizacja metody barwienia preparatów embriologicznych, porównania liczebności kwiatów na roślinach i pobierania nektaru.

Temat badawczy 2. Mikroskopowa ocena rozwoju embriologicznego kwiatów odmiany „Kora” i „Panda” pod wpływem badanych stymulatorów, sporządzanie dokumentacji fotograficznej i opisu.

Temat badawczy 3. Ocena wpływu poszczególnych stymulatorów na liczbę kwiatów wytworzonych przez roślinę.

Temat badawczy 4. Analiza jakościowa i ilościowa nektaru pobranego z nektarników kwiatów traktowanych stymulatorami.

Temat badawczy 5. Ocena wpływu różnych stymulatorów na parametry plonu: liczbę i masę nasion uzyskanych z jednej rośliny gryki oraz masę tysiąca nasion.

Materiał i metodyka

Rośliny w ramach tematu badawczego nr 1 było realizowane w warunkach szklarniowych, natomiast pozostałe tematy na roślinach uprawianych w otwartym tunelu foliowym, zapewniającym kontrolę nawodnienia i oblot owadów zapylających kwiaty gryki. Rośliny opryskiwano roztworami stymulatorów w dwóch terminach: na początku kwitnienia i w fazie pełnego kwitnienia. Po dwóch tygodniach po aplikacji stymulatorów dokonywano oceny rozwoju embriologicznego, oraz wpływu stymulatorów na produkcję kwiatów, aborcję kwiatów, skład ilościowy i jakościowy nektaru. Po zakończeniu wegetacji analizowano parametry plonu: liczbę i masę nasion uzyskanych z jednej rośliny oraz masę tysiąca nasion.

Żywotność pyłku oceniano metodą Alexandra (Dafni 1992), a rozwój woreczków zalążkowych standardową metodą parafinową z hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina w połączeniu z błękitem alcjanowym (Filutowicz i Kuźdowicz 1951) i metodą przejaśniania (Mól 1988). Liczbę kwiatów produkowanych przez jedną roślinę analizowano w 15 powtórzeniach (na 15 roślinach z każdej odmiany, traktowania i terminu aplikacji stymulatorów). Nektar pobierano z 50 kwiatów na każdą próbę (5 prób z każdej odmiany, traktowania i terminu aplikacji stymulatorów), a analizę jego składu wykonywano na HPLC. Parametry plonu oceniano na 20 roślinach z każdego traktowania.

Wyniki i dyskusja

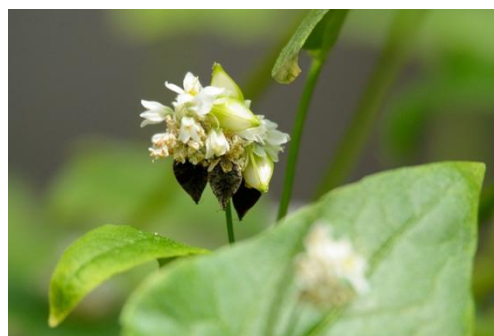
Temat badawczy 1.

Siła kiełkowania nasion obu odmian była bardzo wysoka i wynosiła 93,6% dla odmiany „Kora” i 96,4% dla odmiany „Panda”. Długość fazy kwitnienia wynosiła 70 dni dla odmiany „Kora” i 73 dni dla odmiany „Panda”. Bardzo wcześnie obserwowano zawiązywanie zielonych nasion (po 30 dniach od daty wysiewu) (Fot. 1). Na jednej roślinie można obserwować w tym samym czasie pąki kwiatowe, rozkwitnięte i uschnięte kwiaty, zielone nasiona i dojrzewające nasiona (Fot. 2).

Fot. 1. Kwiatostany gryki wraz z pierwszymi zielonymi nasionami



Fot. 2 Pąki kwiatowe, rozkwitnięte i uschnięte kwiaty, zielone nasiona i dojrzewające nasiona gryki



Oznaczanie liczebności kwiatów

Stwierdzono, że ze względu na bardzo krótki okres kwitnienia pojedynczego kwiatu, należy analizować wszystkie kwiaty na jednej roślinie: pąki kwiatowe, kwiaty w pełni rozwinięte oraz przekwitłe. Nowe pąki kwiatowe powstawały do końca wegetacji roślin. Liczba kwiatów na jednej roślinie obu badanych odmian była bardzo zróżnicowana i wahała się od 249 do 1203.

Metody analizy rozwoju embriologicznego

Żywotność pyłku wstępnie badano trzema testami, acetokarminowym, Alexandra oraz dwuocetanem fluoresceiny (FDA; ang. *fluorescein diacetate*). Do dalszych analiz wytypowano test Alexandra. Do badania zalążków wstępnie wykorzystano dwie metody: przejaśniania całych zalążków salicylanem metylu, pożywką Hoyerera oraz barwienia skrawków parafinowych hematoksyliną żelazistą z błękitem alcjanowym. Przejaśnianie całych zalążków nie dało satysfakcjonujących wyników. Metodą tą możliwa była jedynie analiza późniejszych stadiów rozwojowych oraz wykrywanie degenerujących/zdegenerowanych zalążków. Szczegółowa obserwacja megasporogenezy oraz rozwoju gametofitu żeńskiego możliwa była jedynie na preparatach krojonych, które wykazały, że w kontroli bardzo często rozwój embriologiczny był zakłócony i często, mimo że powstawały zarodki, ulegały one aborcji.

Pobieranie nektaru i analiza jego składu

Wstępne badania wykazały możliwość odwirowywania nektaru z otwartych kwiatów gryki. Ustalono, że 50 kwiatów dostarczy wystarczającą ilość nektaru do analiz chromatograficznych (około 10 µl). Analiza ta wykazała obecność następujących związków: glicerolu, inozytolu, sacharozy,

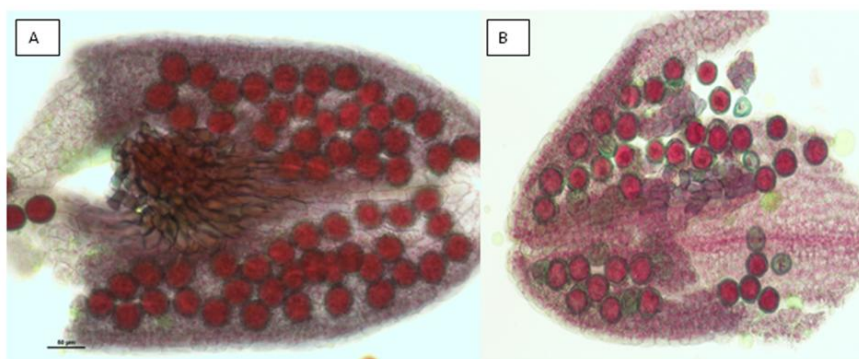
glukozo-6-fosforanu, glukozy, fruktozy, kestozy, nystozy, maltozy oraz maltozotriozy i maltozotetrozy.

Temat badawczy 2.

Analiza embriologiczna

Analiza embriologiczna wykazała wysoką żywotność pyłku (100%) zarówno u roślin kontrolnych obu badanych odmian, jak też po zastosowaniu większości biostymulatorów. Jedynie u odmiany „Kora” NAA zastosowany w II terminie istotnie obniżył żywotność pyłku (o 23% w porównaniu do kontroli). Ziarna pyłku pod wpływem NAA wykazywały zaburzenia w rozwoju (Fot. 3).

Fot. 3. Żywotny pyłek w roślinach kontrolnych odmiany Kora (A), degenerujące ziarna pyłku w roślinach traktowanych NAA (B).

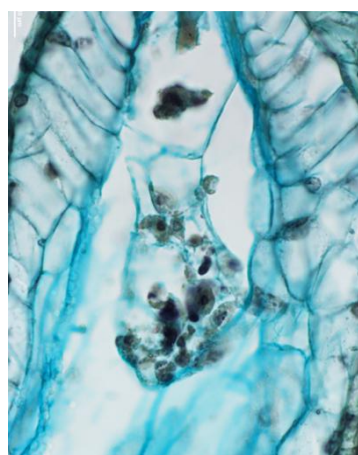


W roślinach kontrolnych obu odmian większość woreczków była rozwinięta prawidłowo (Fot. 4), a w kilku przypadkach obserwowano zdegenerowane woreczki zalążkowe (Fot. 5).

Fot. 4. Prawidłowo rozwinięty woreczek zalążkowy



Fot. 5. Degenerujący zarodek



W roślinach kontrolnych obu odmian większość woreczków była rozwinięta prawidłowo (Fot. 4), a w części przypadków (25-30%) obserwowano zdegenerowane woreczki zalążkowe (Fot. 5). Biostymulatory nie miały istotnego wpływu na rozwój woreczków zalążkowych obu odmian. W roślinach traktowanych stymulatorami zdarzały się przypadki degeneracji woreczków zalążkowych lub zarodków, jednakże w takim samym stopniu, co w roślinach kontrolnych. Degeneracja woreczków zalążkowych lub zalążków mogła następować w wyniku braku zapylenia lub też z powodu upałów notowanych w okresie rozwoju kwiatów (lipiec 2014), co udowodnili Guan i in. (2008). Autorzy ci stwierdzili, że wysoka temperatura powoduje zmniejszenie liczby zawiązanych nasion i zwiększenie ich aborcji lub brak ich wypełnienia.

Wnioski

1. Stymulatory z wyjątkiem NAA nie zakłócają przebiegu mikrosporogenezy, a obie odmiany gryki „Kora” i „Panda” wykazują bardzo wysoką żywotność pyłku. Żywotność pyłku nie jest zatem przyczyną słabego plonowania badanych odmian.
2. W roślinach kontrolnych oraz w roślinach traktowanych różnymi stymulatorami obu badanych odmian gryki część woreczków zalążkowych ulega degeneracji, co jest prawdopodobnie efektem braku zapłodnienia, działania wysokich temperatur lub złej dystrybucji asymilatów.

Temat badawczy 3.

Produkcja kwiatów

Rośliny obu odmian wytwarzały ogólnie większą liczbę kwiatów w II terminie oprysku. W przypadku odmiany „Kora” w I terminie wzrost liczby kwiatów obserwowano pod wpływem BAP i putrescyny. W II terminie największy wpływ na liczbę kwiatów wykazał chlorek sodu i Tytanit. Rośliny odmiany „Panda” w I terminie oprysku wytworzyły więcej kwiatów po zastosowaniu NaCl, a w II terminie po zastosowaniu cysteiny.

Aborcja kwiatów

W przypadku odmiany „Kora” rośliny kontrolne oraz rośliny traktowane BAP w I terminie wykazywały największą aborcję kwiatów, a najmniejszą rośliny traktowane NAA i ASAHI. Rośliny kontrolne w porównaniu do innych roślin traktowanych stymulatorami w II terminie zrzuciły najmniejszą liczbę kwiatów, a najwięcej zrzuciły rośliny traktowane NaCl.

W przypadku odmiany „Panda” w I terminie oprysku rośliny kontrolne i traktowane putrescyną zrzuciły najmniej kwiatów, a najwięcej rośliny traktowane NaCl. W II terminie najmniejszy stopień aborcji obserwowano u roślin traktowanych putrescyną, a największy pod wpływem BAP.

Silna aborcja kwiatów jest przyczyną mniejszych plonów zwłaszcza u roślin strączkowych (Aufhammer i in. 1989, Czyżyło-Mysza i Dubert 2008). Patric (1987) sugeruje, że u bobiku prawdopodobnie auksyna pochodzenia wierzchołkowego reguluje odpadanie organów generatywnych wskutek współzawodnictwa o asymilaty, a nie poprzez polarny i bazypetalny transport w niższych częściach głównego pędu.

Wnioski

1. Największa aborcja kwiatów u obu odmian występuje w roślinach traktowanych stymulatorami w II terminie.

2. ASAHI i putrescyna zmniejszają liczbę odrzuconych kwiatów.
3. Większość stymulatorów zwiększających liczbę kwiatów zwiększa jednocześnie stopień ich aborcji.

Temat badawczy 4.

Rośliny z otwartymi nektarnikami, a do tej grupy zaliczana jest gryka, produkują nektar składający się głównie z cukrów prostych. Fruktaza jest najważniejszym cukrem w składzie nektaru przyciągającym pszczoły, czyniąc nektar bardzo słodkim. Nektar dostarcza pszczolom wielu różnych składników, ale przede wszystkim jest wysokoenergetycznym pokarmem. Oprócz cukrów nektar zawiera związki białkowe, aminokwasy, kwasy organiczne, witaminy, związki fosforowe. Nektar składa się z wody i w 70% z cukrów (Wojtacki 1998).

Analiza chromatograficzna wykazała, że nektar obu badanych odmian gryki zawiera następujące cukry: fruktozę, glukozę, sacharozę, kestozę, nystozę, maltozę. Ponadto wykryto obecność inozytolu, glicerolu, glukozo-6-fosforanu, oraz niewielkie ilości maltozotriozy i maltozotetrozy. Podany skład nektaru jest taki sam, jak miodu gryczanego (Pasini i in. 2013). W I terminie największą ilość nektaru produkowały w przypadku odmiany „Kora” rośliny po traktowaniu cysteiną, a w przypadku odmiany „Panda” rośliny kontrolne i traktowane BAP. Najwięcej cukrów u odmiany „Kora” wykazały rośliny traktowane putrescyną w I terminie, a u odmiany „Panda” roślin traktowane cysteiną w II terminie. Wykazano negatywną korelację pomiędzy zawartością cukrów w nektarze a obfitością nektarowania. Zależność ta wskazuje, że objętość uzyskiwanego nektaru zależy w głównej mierze od jego uwodnienia, a nie od ilości zgromadzonych cukrów. U obu odmian fruktoza stanowiła największy udział procentowy w ogólnej puli cukrów. Glukoza jest drugim cukrem po fruktozie mającym istotny udział w całkowitej puli cukrów. Stymulatory nieznacznie zwiększały zawartość fruktozy, jednakże różnice w zawartości tego cukru w roślinach traktowanych różnymi stymulatorami są nieistotne.

Wnioski

1. Każda z odmian reaguje specyficznie na działanie stymulatorów. Ogólna zawartość cukrów zwiększa się u odmiany „Kora” pod wpływem putrescyny w I terminie aplikacji, a w roślinach odmiany „Panda” pod wpływem cysteiny aplikowanej w II terminie.
2. Głównym składnikiem nektaru gryki zwyczajnej jest fruktoza. Zawartość tego cukru jest najbardziej istotnym parametrem, na który należy zwracać uwagę, a nie na obfitość nektarowania.
3. Zawartość fruktozy w nektarze obu odmian praktycznie nie zmienia się pod wpływem stymulatorów.

Temat badawczy 5.

Najwięcej nasion w przypadku obu odmian uzyskano z roślin traktowanych stymulatorami w I terminie. Liczba nasion w przypadku odmiany „Kora” była największa po zastosowaniu putrescyny, natomiast generalnie nie obserwowano istotnych różnic w działaniu zastosowanych stymulatorów w II terminie. Masa nasion była największa po zastosowaniu Tytanitu w I terminie lub putrescyny w I i II terminie. Masa tysiąca nasion uzyskanych z roślin traktowanych różnymi stymulatorami nie różniła się istotnie. Masa nasion odmiany „Panda” była największa po zastosowaniu ASAHI lub putrescyny w I terminie, i pod wpływem cysteiny aplikowanej w II terminie. Podobnie jak u odmiany „Kora”, nie obserwowano istotnego wpływu biostymulatorów na masę tysiąca nasion. U obu odmian znaleziono silną korelację pomiędzy liczbą kwiatów a ich aborcją. Nie obserwowano istotnej zależności pomiędzy liczbą kwiatów a liczbą dojrzałych nasion. U odmiany „Kora” istnieje ponadto silna ujemna

korelacja pomiędzy liczbą i masą nasion a aborcją kwiatów. Nie znaleziono wpływu poszczególnych stymulatorów na masę pojedynczego nasiona. Aborcja kwiatów nie ma wpływu w tym przypadku na masę pojedynczego nasiona. Wynik ten jest dość zaskakujący i może wskazywać, że słaby plon gryki zwyczajnej nie wynika z procesu zapłodnienia, a raczej ze słabej dystrybucji asymilatów. Podobne zależności znaleziono w przypadku odmiany „Panda”.

Problem słabego plonowania gryki wynika najprawdopodobniej z bardzo rozciągniętej w czasie fazy kwitnienia, praktycznie do końca wegetacji rośliny. Roślina mając zatem do „wykarmienia” powstające nasiona, wciąż produkuje nowe kwiaty, które stanowią dla nasion silną konkurencję o asymilaty.

Wnioski

1. Liczba i masa nasion produkowanych na jednej roślinie obu odmian jest większa po zastosowaniu stymulatorów na początku kwitnienia.
2. Najlepsze efekty w stymulowaniu zawiązywania nasion oraz uzyskiwaniu ich masy daje putrescyna, Tytanit i ASAHl.

Wnioski końcowe

1. Przebieg rozwoju pyłku u obu odmian gryki „Kora” i „Panda” przebiega prawidłowo.
2. Woreczki zalążkowe obu badanych odmian degenerują pod wpływem wysokiej temperatury w okresie kwitnienia.
3. Obie odmiany gryki reagują specyficznie na zastosowane stymulatory.
4. Obie odmiany produkują większą liczbę kwiatów w późniejszej fazie rozwoju. Spośród badanych stymulatorów BAP, NaCl, putrescyna, cysteina i Tytanit zwiększają liczbę kwiatów, ale tylko putrescyna i ASAHl istotnie zmniejszają liczbę odrzuconych kwiatów. Pozostałe stymulatory zwiększające liczbę kwiatów zwiększają jednocześnie stopień ich aborcji. Największa aborcja kwiatów następuje pod wpływem stymulatorów aplikowanych w pełnej fazie kwitnienia.
5. Zawartość cukrów w nektarze zwiększa się pod wpływem putrescyny i cysteiny. Stymulatory te jednak nie mają wpływu na procentowy udział fruktozy – głównego składnika nektaru.
6. Pomiędzy liczbą wyprodukowanych kwiatów przez rośliny obu badanych odmian gryki a liczbą uzyskanych nasion nie ma istotnej korelacji. Skuteczność działania stymulatorów na liczbę nasion jest większa, gdy substancje te są stosowane na początku kwitnienia. Najlepsze efekty w stymulowaniu zawiązywania nasion oraz uzyskiwaniu ich masy daje putrescyna, Tytanit i ASAHl.

Spis literatury:

- Adachi T., Kawabata K., Matsuzaki N. 1083. Observation of pollen tube elongation, fertilization and ovule development in autogamous autotetraploid buckwheat. Proc. 2nd Int. Symp. Buckwheat Miyazaki Buckwheat Research: 103-113.
- Aufhammer W., Gotz I., Peter M. 1987. Yield performance of field bean (*Vicia faba* L.) in relation to interactio between inflorescence at different nodes. Cambridge. J. Agric. Sci. 108: 479-486.
- Björkman T., Samimy C., Pearson H. 1995. Variation in pollen performance among plants of *Fagopyrum esculentum*. Euphytica 82: 235-240.
- Cawoy V., Ledent J-F., Kinet J-M., Jacquemart A-L. 2009. Floral biology of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench. The Eaupoen Journal of Plant Science and Biotechnology 3: 1-9.
- Czyczyło-Mysza I., Dubert F. 2006. Wpływ egzogennej auksyny lub cytokininy, stosowanych w miejscu dakapitacji, na plonowanie roślin bobiku (*Vicia faba* L. *minor*). Z. Probl. Post. Nauk Rol.

- Dafni A. 1992. Pollination Ecology: A Practical Approach (Practical Approach Series). Oxford University Press. U.S.A.
- Filutowicz A., Kuźdowicz A. 1951. Mikrotechnika roślinna. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
- Guan L., Chen L., Adachi T. 2008. Ultrastructural studies of embryo abortion in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) as a heat-stress. *Cytologia* 73: 371-379.
- Jabłoński B. 2003. Metodyka badań obfitości nektarowania kwiatów i oceny miododajności roślin. Oddział Pszczelnictwa Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa Skierniewice.
- Janeczko A., Oklešková J., Siwek A., Dziurka M., Pocięcha E., Kocurek M., Novák O. 2013. Endogenous progesterone and its cellular binding sites in wheat exposed to drought stress. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138: 384–394
- Janeczko A., Biesaga-Kościelniak J., Oklešková J., Filek M., Dziurka M., Szarek-Łukaszewska G., Kościelniak J. 2010. 24-Epibrassinolide in wheat production: physiological activity and uptake. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 311-321.
- Joachimiak A. 1994. Analiza kariotypu roślin. Uniwersytet Jagielloński. Instytut Botaniki. Kraków.
- Młodzianowski F., Woźny A. 1990. Wykłady i ćwiczenia z biologii komórki roślinnej. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. 344.
- Mól R. 1988. Metody przejaśniania tkanek stosowane w embriologii roślin. *Wiadomości Botaniczne* 32: 201-208.
- Pasini F., Gardini S., Marcazzan G.L., Caboni M.F. 2013. Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. *Food Chem.* 141: 2802–2811.
- Patric J.W. 1987. Are hormones involved in assimilate transport? W: Hormone action in plant development. A Critical Appraisal. London. Butterworths (eds. Hoad G.V., Lenton J.R., Jackson M.B., Actin P.K.), pp. 175-187.
- Shaikh N.Y., Guan L.M., Adachi T. 2001. Ultrastructural analyses on breeding barriers in post-fertilization of interspecific hybrids of buckwheat. The proceeding of the 8th ISB: 319-329.
- Singh R.J. 2003. Plant Cytogenetics. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Wojtacki M. 1998. Produkty pszczele i przetwory miodowe. PWRiL Warszawa.
- Woo S.H., Ohmoto T., Campbell C., Adachi T., Jong S.K. 2001. Pre- and post-fertilization to backcrossing in interspecific hybridization between *Fagopyrum esculentum* and *F. homotropicum* with *F. esculentum*. The proceeding of the 8th ISB: 450-455.
- Żur I., Klein M., Dubert F., Samek L., Waligórska H., Żuradzka I., Zawislak E. 2003. Environmental factors and genotypic variation of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. var *capitata*, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45(1): 49-52.

Część wyników została zaprezentowana w postaci posteru i streszczenia na III Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – Od rośliny modelowej do nowej odmiany. Poznań 5-7 listopada 2014.

Płazek A., Dubert F., Słomka A., Kopeć P., Dziurka M. Influence of several biostimulators on embryological development and florescence of common buckwheat. Program i streszczenia. Poznań 5-7 listopada 2014, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, str. 101

Influence of biostimulators on embryological development and florescence of common buckwheat

Agnieszka Płazek¹, Aneta Słomka², Franciszek Dubert³, Michał Dziurka³, Przemysław Kopeć¹

¹Department of Plant Physiology, University of Agriculture, Podluzna 3, 30-239 Kraków, Poland e-mail: rrpłazek@cyf-kr.edu.pl

²Department of Plant Cytology and Embryology, Jagiellonian University, Grodzka 52, 31-044 Kraków, Poland

³The Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, Poland



Introduction

Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) of *Polygonaceae* is included agronomically to cereals due to similar seed chemical composition and cultivation methods. Its seeds are characterized by high content of proteins and absence of gluten. Straw is used as an animal food. This plant possesses phytosanitary properties, high ability to absorb nitrogen and phosphorus from the soil, resistance to pests and diseases, and low sensitivity to soil conditions. However common buckwheat is not very popular, due to low level of yield and its unreliability. Buckwheat is a plant pollinated by bees and is highly valued as a source of honey. Its major disadvantage is the very short lifetime of single flower which could be able to be pollinated during only one day (Cawoy et al. 2009). Moreover buckwheat is characterized by short vegetation period (70-90 days). It is thermophilic plant, sensitive to spring frost, so it can be sown to soil of 8-10°C (15-25 May). Too high temperature and drought cause drying out of buds (Adachi et al., 1983). Up to day, a crossing *Fagopyrum homotropicum* × *F. tataricum* with *F. esculentum* aimed to transfer of frost resistance genes, the ability to set more seeds, however there is a very strong barrier to prevent cross-breeding between different species, and so far, this type of action were unsuccessful (Woo in 2001, Shaikh in 2001). The results of many studies indicate that the main causes of poor seed setting resulting from self-incompatibility is dimorphic heterostyle and faulty development of the embryo sacs (Adachi et al. 1983, Björkman et al. 1995, Woo et al. 2001).

The aim of the work was to investigate influence of various biostimulators on flower production and embryological development of two Polish common buckwheat cultivars.

Material and methods

Plants of cvs. 'Kora' and 'Panda' were cultivated in pots filled with commercial soil under open foil tunnel from 25 May to 26 September. Plants were fertilized every two weeks with Florovit. In the experiment following stimulators were used: NAA (50 mg/l), GA₃ (100 mg/l), BAP (50 mg/l), NaCl (10 mg/l), putrescine (290 mg/l), cysteine (100 mg/l) as well as commercial products TYTANIT (0.3 ml/l) and ASAHI SL (1 ml/l). They were applied on plants in the beginning (I term) or during full flowering (II term). Control plants were treated with distilled water. Two weeks after stimulator application number of flowers was analysed. Moreover, well developed flowers (Fot. 9) (50 per one plant) were collected for embryological and nectar composition (using HPLC method) analyses. 500 pollen grains/treatment were isolated from fixed in FAA solution flowers, stained with Alexander dye (Singh, 2003) and observed under light microscope. Viable pollen grains become purple, whereas non-viable remain green or transparent. Ovules fixed with FAA solution were dissected from the ovary, dehydrated in a graded series of absolute ethanol, cleared with a graded concentration of methyl salicylate diluted with absolute ethanol (Herr, 1971). Samples were observed in Nikon Eclipse 80i light microscope with differential interference contrast (DIC). Results obtained were analysed for normal distribution using Shapiro-Wilk test, transformed using Cox-Bosch test and analysed by multiple range Duncan's test (p<0.05). Viability of pollen was analysed using non-parametric Mann-Whitney test.

Results

Plants grew very well under foil tunnel (Fot. 1) and we observed many bees pollinating flowers (Fot. 2). On the same plant flower buds, developed flowers, as well as green and ripe seeds were noted (Fot. 3).



Embryological analyses showed very high pollen viability of both studied cultivars (98-100%) (Table 1). Among applied stimulators only NAA decreased pollen viability: in the case of 'Kora' about 23.2% and 'Panda' about 2%. Pollen of flowers treated with NAA in the I or II term demonstrated development disturbance (Fot. 4-5), in contrast to other treatments (Fot. 6).

Table 1. Pollen viability of buckwheat under influence of various biostimulators

Kora			Panda		
Treatment	I term	II term	Treatment	I term	II term
Control	100.0	99.8	Control	99.4	99.8
NAA	98.8	76.8	NAA	97.6	98.0
BAP	100.0	99.6	BAP	99.2	98.2
NaCl	99.6	99.8	NaCl	99.6	99.6
ASAHI SL	99.4	99.6	ASAHI SL	99.0	99.8
Cysteine	99.4	99.6	Cysteine	99.0	99.4
TYTANIT	99.4	99.6	TYTANIT	99.0	99.6
GA ₃	99.0	99.8	GA ₃	99.0	99.2
Putrescine	100.0	100.0	Putrescine	99.6	99.6

Fot. 9. Flowers collected for nectar analyses



In control plants of both studied cultivars some degenerated embryo sacs were observed (Fot. 7), however most of embryos were properly developed (Fot. 8). Degeneration of embryo sacs could be caused by high temperature noted in July or due to lack of pollination. Analyses of microscope slides of other treatments are still in progress.



Conclusions

Both studied cultivars respond specifically to each biostimulator. In the case of 'Kora' the term II of stimulator application is more favourable for flower production than term I, while in the case of 'Panda' both terms increase flower number. Flower production is stimulated by NaCl, cysteine, putrescine and BAP. Fructose content is more valuable feature than nectar amount. 'Panda' cultivar is more sensitive to biostimulator application than 'Kora'. All stimulators applied in both terms increase fructose amount in plants of 'Panda', however this increase of fructose content is most visible under influence of NaCl, Tytanit, ASAHI, GA₃ and NAA.

Plants of 'Kora' demonstrated higher flower number in the II term under influence of most stimulators compared to the I term, however number of control flowers was similar (Table 2). In the I term the highest flower production was observed after BAP (124% of the control) and putrescine (120%) application, while in the II term most effective were NaCl (145%) and TYTANIT (143%).

Plants of 'Panda' demonstrated in the I term of all studied biostimulator application significantly higher flower number compared to that of the control, however control plants demonstrated also higher flower number in the II term than in the I term (Table 3). In the I term the most effective was NaCl giving 84 percentage-increase in flower production, while in the II term cysteine caused increase in flower number of 30% compared to the control.

Table 3. Number of flowers per plant of cv. 'Kora' and 'Panda'. Means (n=20) marked with the same letter do not differ significantly (multiple range Duncan's test: p<0.05)

Kora			Panda		
Stimulator	I term	II term	Stimulator	I term	II term
Control	318 cd	321 c	Control	168.6 f	419 b
Cysteine	249 e	413.4 abc	Cysteine	272.3 de	546 a
NAA	259.3 e	434.7 bc	NAA	247.3 de	468.8 ab
GA ₃	322.5 cd	342.3 bc	GA ₃	246.3 de	373.6 b
Tytanit	331.3 bcd	458.2 a	Tytanit	416 ab	428.5 b
NaCl	365.7 abc	464.8 a	NaCl	477.8 a	390.3 b
Putrescine	382.3 ab	372 abc	Putrescine	228.5 ef	449.2 ab
BAP	395.8 a	346.8 bc	BAP	310.3 cd	467.2 ab
ASAHI SL	277.6 de	381 abc	ASAHI SL	369 ab	468 ab

The greatest amount of nectar was obtained in plants of Kora after treatment with cysteine applied in the first term (Table 4). Panda control plants and those after BAP treatment in the first term have given the highest amount of nectar. Nectar of both studied cultivars contained fructose, glucose, sucrose, kestose, maltose and nystose. In the case of Kora plants the most sugar content in nectar was determined after putrescine treatment in the I term, while in Panda plants treated with cysteine in the II term. Percentage content of fructose in total sugar amount was the highest in Panda plants under Tytanit and NAA treatment in the I term, and after NaCl treatment in the II term. Generally, all biostimulators increased percentage fructose content in Panda plants compared to that of the control, while 'Kora' plants responded less effectively to stimulator treatment. The negative correlation ($r = -0.45$; $p < 0.05$) between sugar content and nectar amount was found.

Table 4. Analyses of nectar amount and its composition under stimulators treatment (stars mark the highest effectiveness of stimulator treatment)

Kora									
Stimulator	Nectar amount		Summ of sugars		Percentage of fructose				
	Term I	Term II	Term I	Term II	Term I	Term II	Term I	Term II	
Control	86.7	71.3	30.9	28.0	46.1	43.3			
BAP	87.1	59.5	31.1	38.8	46.3	45.2			
Cysteine	169.0*	80.4*	20.5	38.9	38.4	45.2			
NaCl	92.4	58.1	37.6	44.4*	46.3	45.2			
Putrescine	89.5	73.1	46.4*	35.0	47.1*	45.3			
Tytanit	68.1	63.1	32.6	41.2	44.2	45.8			
ASAHI	78.0	81.4*	35.5	34.1	45.4	44.0			
GA ₃	71.7	75.2	26.6	33.4	45.2	44.6			
NAA	88.2	57.0	32.3	36.7	43.6	42.9			
Panda									
Stimulator	Nectar amount		Summ of sugars		Percentage of fructose				
	Term I	Term II	Term I	Term II	Term I	Term II	Term I	Term II	
Control	128.2*	70.4	26.8	30.4	41.7	43.1			
BAP	127.3*	65.9	19.5	35.2	45.7	47.7			
Cysteine	106.9	81.1	19.6	48.6*	48.5	46.0			
NaCl	103.9	86.8*	39.5	32.5	45.7	50.0*			
Putrescine	89.7	74.5	26.3	37.7	47.8	44.7			
Tytanit	86.8	71.9	42.2*	46.6*	50.0*	47.3			
ASAHI	85.4	75.9	41.4*	37.1	49.7*	47.0			
GA ₃	76.9	61.4	32.1	33.6	49.6*	48.2*			
NAA	76.6	67.4	42.4*	31.3	50.9*	45.6			

Acknowledgments

The study was supported by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development
No. HORh078/PB/34/14

References:
Adachi T., Kawabata K., Matsuzaki N. 1983. Observation of pollen tube elongation, fertilization and ovule development in autogamous and allogamous buckwheat. Proc. 2nd Int. Symp. Buckwheat & Karyops Buckwheat Research 103-113.
Björkman T., Sjöberg C., Pearson H. 1995. Variation in pollen performance among plants of *Fagopyrum esculentum*. Euphytica 82: 235-240.
Cawoy V., Lédet J-F., Kier J-W., Jacquemart A-L. 2009. Floral biology of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). The European Journal of Plant Science and Biotechnology 3: 1-5.
Dziurka M., Słomka A., Adachi T. 2000. Ultrastructural analysis on breeding barriers in post-fertilization of interspecific hybrids of buckwheat. The proceedings of the IP 128: 319-320.
Woo S-H., Okamoto T., Campbell C., Adachi T., Jong S-K. 2000. Pre- and post-fertilization to backcrossing in interspecific hybridization between *Fagopyrum esculentum* and *F. homotropicum* with *F. esculentum*. The proceedings of the IP 128: 450-455.