

Kierownik projektu: prof. dr hab. Agnieszka Płazek, Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny.

Celem projektu jest zbadanie mechanizmu aborcji kwiatów i zarodków gryki zwyczajnej pod wpływem stresu termicznego lub troficznego.

WSTĘP

Gryka (*Fagopyrum esculentum*) jest cenną rośliną z rodziny *Polygonaceae*, uprawianą głównie na cele spożywcze ze względu na bardzo dobry skład chemiczny nasion, a zwłaszcza na bardzo wysoką zawartość lizyny i innych aminokwasów. Nasiona te zawierają także skrobię, ale pozbawioną glutenu (Sławinska i Obendorf 2001). Nektar gryki jest źródłem cenionego miodu, a ziarno i słoma są używane jako pasza dla zwierząt. W klimacie Polski roślina ta słabo plonuje ze względu na krótką żywotność pojedynczego kwiatu oraz nieprawidłowy rozwój woreczków zalążkowych. Gatunek ten cechuje samoniezgodność, wynikająca z występowania heterostylii, tj. kwiatów typu Pin i Thrum, o zróżnicowanej długości słupków i pręcików (Cawoy i in. 2007). Do zapłodnienia dochodzi tylko wtedy, gdy nastąpi zapylenie krzyżowe pomiędzy tymi typami kwiatów. Gryka kwitnie przez cały okres wegetacji, co powoduje występowanie silnej konkurencji o asymilaty pomiędzy zawiązanymi już nasionami a wciąż produkowanymi kwiatami. Dodatkowo, gryka jest wrażliwa na wiele stresów środowiskowych m.in. na przymrozki, upały i suszę występujące w okresie letnim. Czynniki te powodują przedwczesne opadanie kwiatów i zawiązków.

Wyniki projektu realizowanego w latach 2014-2016, dotyczącego biologii kwitnienia i plonowania polskich odmian i rodów gryki wskazują, że im więcej kwiatów produkuje roślina gryki, tym większa jest ich aborcja, a liczba kwiatów koreluje ujemnie z liczbą dojrzałych nasion. Zwiększanie liczby kwiatów na roślinie nie poprawia zatem plonu. Żywotność pyłku badanych odmian i rodów jest bardzo wysoka (97 do 100%), co świadczy, że proces mikrogametofitogenezy przebiega prawidłowo i nie tutaj leży przyczyna słabego zawiązywania nasion. Liczba zdegenerowanych woreczków zalążkowych natomiast w tych roślinach jest wysoka i waha się od 10 do 30%. Degeneracja woreczków zalążkowych i zarodków może wynikać z cech genotypowych, wysokiej temperatury podczas kwitnienia oraz z braku asymilatów. Kwiaty wykazują zdolność do zapłodnienia w ciągu zaledwie jednego dnia (Słomka i in. 2017).

Celem projektu jest zbadanie głównych przyczyn i mechanizmu zaburzeń w rozwoju embrionalnym oraz odpadania kwiatów i niedojrzałych nasion gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum*). Procesy te wpływają istotnie na obniżenie plonu nasion. Pojedyncza roślina wytwarza bardzo dużą liczbę kwiatów (od 500 do 2000), ale tylko niewielka część z nich zawiązuje nasiona. Gryka kwitnie do końca wegetacji, co powoduje, że wciąż powstające kwiaty konkurują z zawiązanymi już nasionami o asymilaty (głównie cukry), produkowane przez liście. Prowadzi to do odpadania kwiatów, słabego wypełniania nasion lub odpadania niedojrzałych nasion. Ponadto, gryka jest bardzo wrażliwa na przymrozki, suszę czy wysoką temperaturę, które zwiększają odsetek zrzucanych kwiatów i zawiązków. Gryka jest rośliną chłodowrażliwą, dlatego też wysiewa się ją zazwyczaj między 15 a 25 maja, a jej okres wegetacyjny w klimacie Polski jest stosunkowo krótki i wynosi 70-90 dni.

MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone na roślinach gryki polskiej odmiany Panda i rodu PA15 pod otwartym tunelem foliowym. Nasiona zostały dostarczone przez hodowców gryki Zakładu Produkcyjnego w Palikijach (Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.). Odmiana Panda i ród PA15 wykazują istotne zróżnicowanie pod względem degeneracji zalążków i zarodków oraz plonowania nasion. W kwiatach odmiany Panda dochodzi do degeneracji 30% woreczków zalążkowych, co przekłada się na niskie plonowanie, natomiast w przypadku rodu PA15 tylko 10% woreczków wykazuje zaburzenia rozwojowe.

W 2019 roku badano wpływ warunków troficznych *in planta* na rozwój embriologiczny i plonowanie roślin gryki. Rośliny uprawiano od maja do września w doniczkach w tunelu otwartym umożliwiającym oblot owadów, (z naszych wcześniejszych obserwacji wynika, że choć nie ma w okolicy naszej uczelni zbyt dużo pszczół, natomiast muchówki i trzmiele doskonale spełniają rolę zapylaczy). Część roślin prowadzono w uprawie jednopędowej (boczne pędy usuwano sukcesywnie), na drugiej części roślin usuwano 50 lub 75% kwiatów. W pozostawionych na roślinach kwiatach analizowano w trzech terminach przebieg procesów embriologicznych (do etapu dojrzałego gametofitu żeńskiego) oraz wyznaczano profil hormonalny. Na roślinach kontrolnych pozostawiano pędy boczne i wszystkie kwiaty. Liczba kwiatów produkowanych przez jedną roślinę oceniano w 20 powtórzeniach (na 20 roślinach) z każdego traktowania. Pod koniec sierpnia zebrano nasion. Liczbę nasion pełnych i pustych, masę nasion pełnych przeliczano na jedną roślinę. Ponadto, obliczono masę tysiąca nasion (MTN). Analizę parametrów plonu dokonywana w 20 powtórzeniach. Po analizie nasion obliczono procent aborcji kwiatów według wzoru: $(1 - \text{liczba nasion} / \text{liczba kwiatów}) \times 100\%$. Przeprowadzono również analizę zależności pomiędzy liczbą kwiatów, a liczbą uzyskanych nasion z jednej rośliny, liczbą kwiatów i masą nasion, aborcją kwiatów a pozostałymi parametrami plonu.

Analiza embriologiczna

Materiał ze wszystkich trzech doświadczeń utrwalano w FAA (mieszanie formaliny, alkoholu i kwasu octowego). Wszystkie badania embriologiczne pyłku i zalążków (rozwój gametofitu żeńskiego) wykonano standardową metodą parafinową z hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina w połączeniu z błękitem alcjanowym (Filutowicz i Kuźdowicz 1951) i/lub metodą przejaśniania tkanek w salicylanie metylu (Mól 1988). Pyłek barwiono odczynnikami Alexandra (Singh, 2003). Preparaty obserwowano w mikroskopie świetlnym (Nikon Eclipse 80i) w jasnym polu lub kontraście Nomarskiego.

Analiza profilu hormonalnego

Profil fitohormonów w kwiatach i liściach donorowych (kwasu indolilo-3-octowego, giberelowego, zeatyny, kinetyny, poliamin kwasu abscysynowego, jasmonowego i salicylowego,) oznaczano według Dziurki i in. (2016). Fitohormony ekstrahowano ze zliofilizowanego materiału do roztworu wodnego kwasu mrówkowego w metanolu (4/1/15 v/v). Ekstrakt po odwirowaniu odparowywano w atmosferze azotu, a pozostałość zawieszano w 1 M kwasie mrówkowym i oczyszczano na hybrydowych kolumnach SPE o mieszanym mechanizmie retencji (30 mg, 1 ml). Następnie próbki zagęszczano przez odparowanie w atmosferze N₂. Do prób dodano ściśle określoną ilość znakowanych stabilnymi izotopami standardów wewnętrznych (Olchemim, Czechy). Próbkę analizowano na ultra wysokosprawnym chromatografie cieczowym sprzężonym z tandemowym kwadrupolowym detektorem spektrometrii mas (UHPLC-MS/MS Agilent 1260). Fitohormony wykrywano w trybie jonów dodatnich po jonizacji w trybie ESI (electrospray ionisation) pod ciśnieniem atmosferycznym, z wykorzystaniem techniki monitorowania jonów potomnych MRM (multiple reaction monitoring).

Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki poddano analizie wieloczynnikowej wariancji (ANOVA/MANOVA). Różnice pomiędzy średnimi obliczano wielokrotnym testem Duncan'a ($p < 0,05$). Na wykresach przedstawiono średnie $\pm$ BS (błąd standardowy). Korelacje pomiędzy badanymi parametrami (współczynnik Pearsona) badano przy $p < 0,05$. W przypadku rozkładu nienormalnego zastosowano test nieparametryczny χ^2 .

WYNIKI I DYSKUSJA

Żywotność pyłku

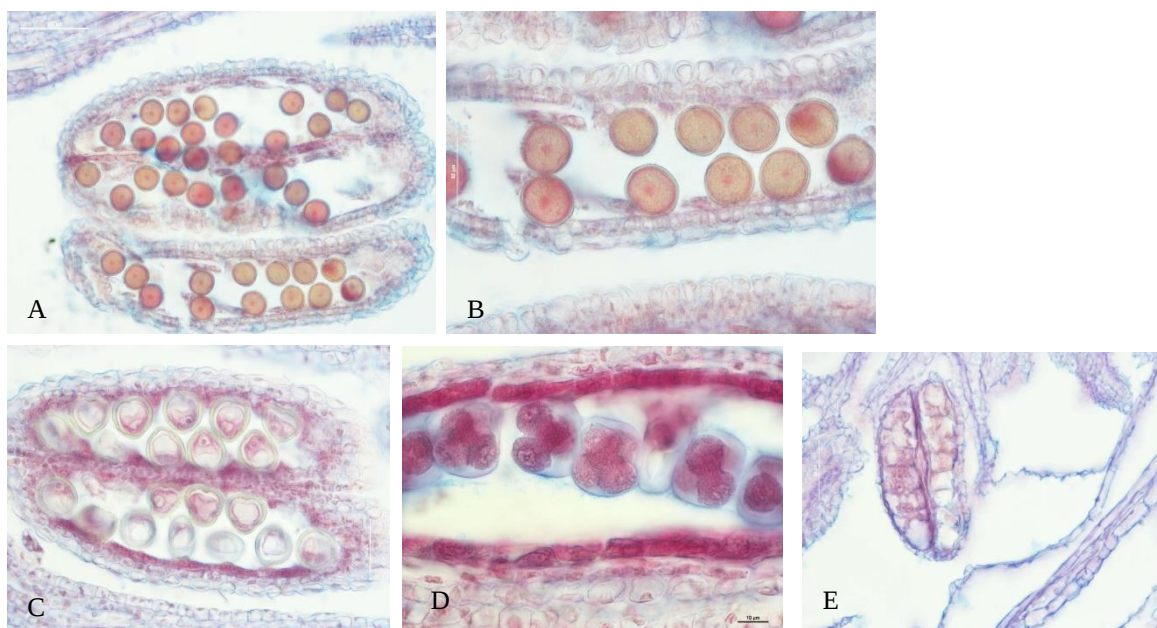
Sposób uprawy roślin odmiany Panda miał wpływ na żywotność pyłku (Tabela 1). U roślin odmiany Panda procent zdegenerowanych nasion pyłku był średnio 2 razy większy niż u rodu PA 15. Usunięcie bocznych pędów nie miało wpływu na procent zdegenerowanych ziaren w kwiatach pędu głównego. Żywotność pyłku zwiększyła się wyraźnie po usunięciu części kwiatów, a zwłaszcza po usunięciu 75% kwiatów. Istotnych różnic nie zanotowano natomiast u roślin rodu PA15, aczkolwiek w tym przypadku zauważa się tendencję zmniejszania stopnia degeneracji pyłku po usunięciu zwłaszcza 50% kwiatów (Fot. 1).

Tabela 1. Procent zdegenerowanych ziaren pyłku w kwiatach roślin gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jednopędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. Gwiazdką zaznaczono istotną różnicą uzyskanymi wynikami a kontrolą (test χ^2 ; $p < 0,05$).

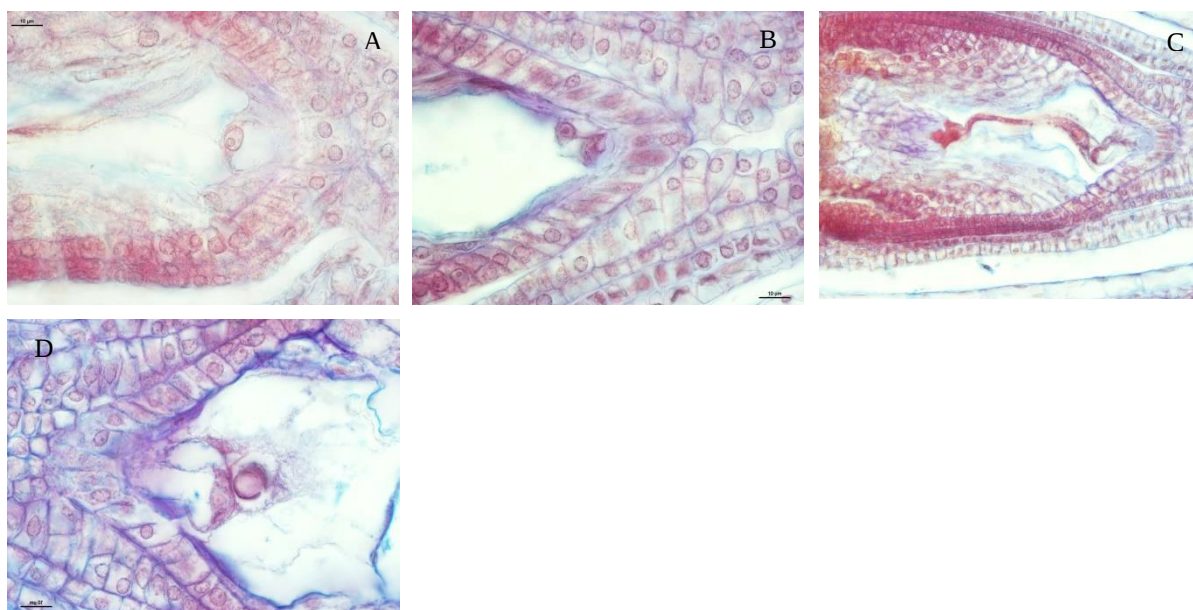
Genotyp	Traktowanie	% zdegenerowanych
Panda	Kontrola	3,2
	Jednopędowe	3,1
	50 % kwiatów	2,2*
	75 % kwiatów	1,1*
PA15	Kontrola	1,3
	Jednopędowe	1,6
	50 % kwiatów	0,9
	75 % kwiatów	1,2

Rozwój woreczków zalążkowych w kwiatach roślin PA15 i Panda w uprawie jednopędowej oraz po usunięciu 50% i 75% kwiatów przedstawiają fotografie 2-4.

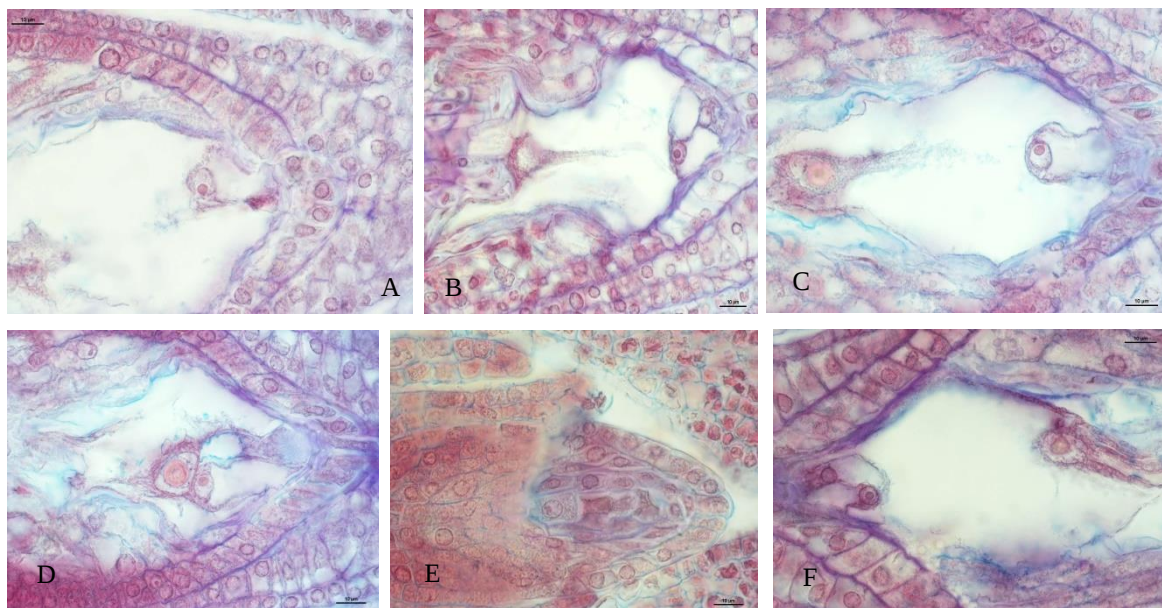
We wszystkich przypadkach zanotowano prawidłowo rozwinięte woreczki zalążkowe, jak i różne ich degeneracje. Do najczęstszych degeneracji należały zdegenerowane synergidy i antypody (Fot. 3A, B). Prawidłowy rozwój woreczków przedstawiono na Fot.2, 3C-F, oraz Fot. 5. W niektórych kwiatach obserwowano już powstawanie prawidłowo rozwijających się prazarodków i zarodków (Fot. 4 A, B). Ze wstępnych analiz wynika, że procent zdegenerowanych woreczków zalążkowych u rodu PA15 był większy niż u odmiany Panda. Większą liczbę prawidłowo rozwiniętych woreczków odnotowano w roślinach odmiany Panda uprawianych jednopędowo, oraz w roślinach rodu PA15, w których usunięto 50% kwiatów. Procent zdegenerowanych woreczków zalążkowych w zależności od sposobu uprawy przedstawia Tabela 2.



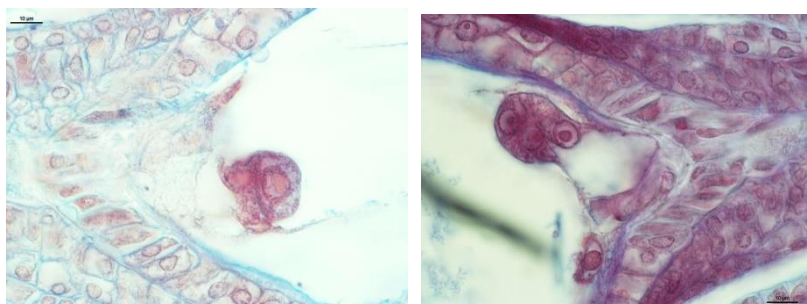
Fot. 1. Prawidłowo rozwinięte ziarna pyłku w kwiatach roślin PA15 prowadzonych w uprawie jednopędowej (A, B), pyłek (C) i tetrady mikrospor (D), tapetum (E) w kwiatach roślin odmiany Panda z 50% usuniętych kwiataów.



Fot. 2. Komórka jajowa w kwiatach PA15 w uprawie jednopędowej (A), komórka jajowa i synergida (B), 7-komórkowy gametofit (C), cały aparat jajowy i jądro wtórne (D) w kwiatach roślin z 50% usuniętymi kwiataami.



Fot. 3. Komórka jajowa i zdegenerowane synergidy (A), komórka jajowa, synergida i druga zdegenerowana synergida (B), komórka jajowa i jądro wtórne (C), prawidłowo rozwinięty woreczek zalążkowy (D), w roślinach kontrolnych odmiany Panda, tetrada megaspor (E) i prawidłowo rozwinięty woreczek zalążkowy (F) w roślinach odmiany Panda z 50% usuniętych kwiatów.



Fot. 4. Prazarodek (A) i zarodek (B) w kwiatkach roślin kontrolnych odmiany Panda

Usuwanie konkurencyjnych organów w większości przypadków zwiększyło procent nieprawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych. Najbardziej negatywny wpływ na frekwencję prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych miało usuwanie 75% kwiatów (Fot. 6). Uprawa jednopędowa obniżyła również procent prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych, ale w dużo mniejszym stopniu niż usuwanie 75% kwiatów. Usuwanie 50% kwiatów nie wpłynęło na procent prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych (w przypadku odmiany 'Panda') albo wręcz zwiększyło ten procent (u rodu PA15) (Fot.5). Mimo to, że w tym ostatnim przypadku frekwencja wadliwych woreczków zalążkowych wyniosła tylko 3%, nie zmniejszyło to stopnia aborcji kwiatów, co mogło być spowodowane ograniczonym zapyleniem lub zaburzeniami w rozwoju zarodka, które w kwiatkach u odmiany Panda wyniosły we wcześniejszych badaniach 9 i 13% w zależności od typu kwiatu (Pin i Thrum) (Słomka i in. 2017). W przypadku rodu PA15 zmniejszenie liczby wadliwie rozwiniętych woreczków zalążkowych wpłynęło jednak na wzrost plon nasion uzyskanych z roślin, z których usunięto 50% kwiatów. Tegoroczne badania potwierdziły wyniki uzyskane w poprzednim roku realizacji

projektu, że ród PA15 wykazuje większy procent degeneracji woreczków zalążkowych w roślinach kontrolnych niż odmiana Panda (Płazek i in. 2019).

Tabela 2. Procent degeneracji woreczków zalążkowych i zalążków w kwiatach roślin gryki zwyczajnej odmiany Panda i roku PA15 uprawianych jako jeden pęd lub po usunięciu 50% lub 75% kwiatów. Rośliny kontrolne nie poddawano żadnym zabiegom. Gwiazdką oznaczono wartości istotnie różniące się od kontroli (test chi2 przy $p < 0,05$)

Traktowanie	Panda	PA15
Kontrola	10	23
1 pęd	50*	40*
50%	15	3*
75%	66*	85*

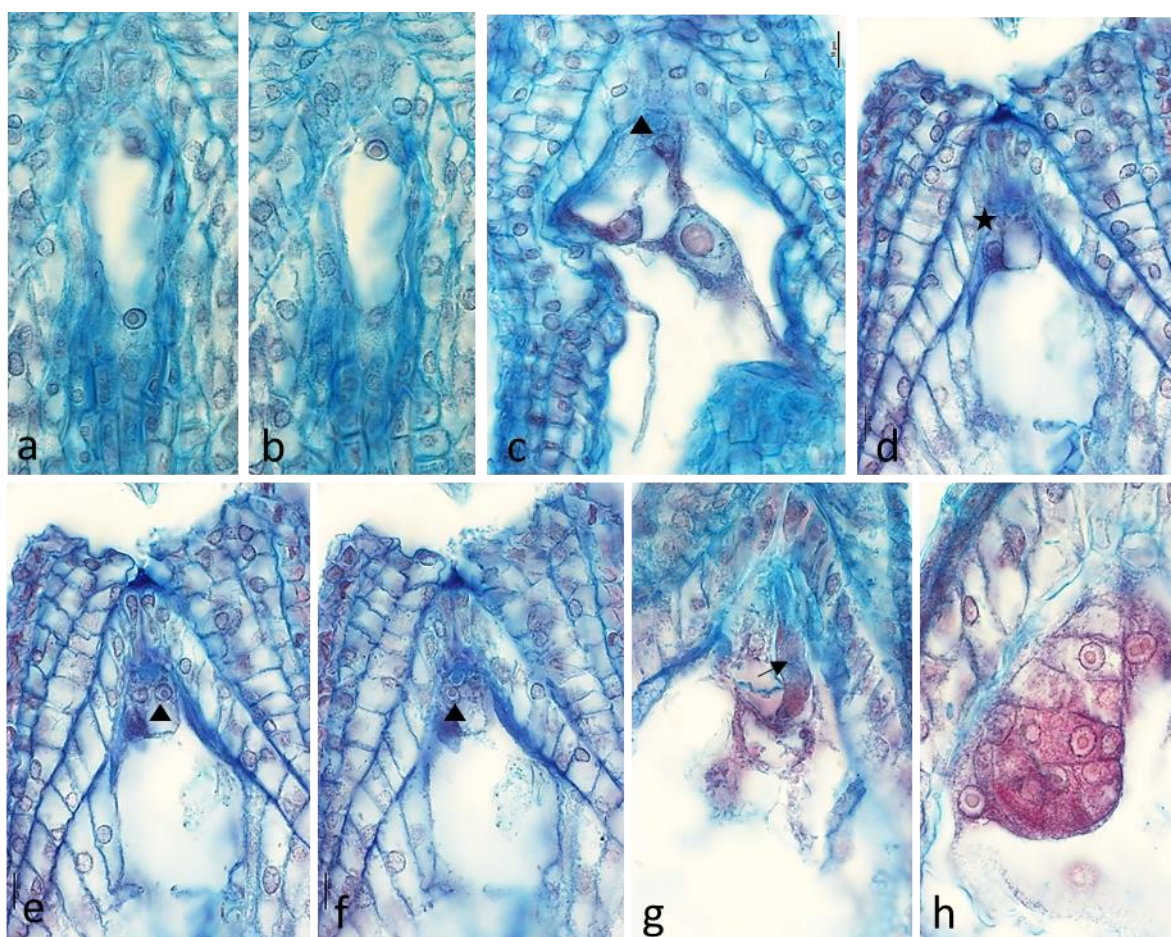
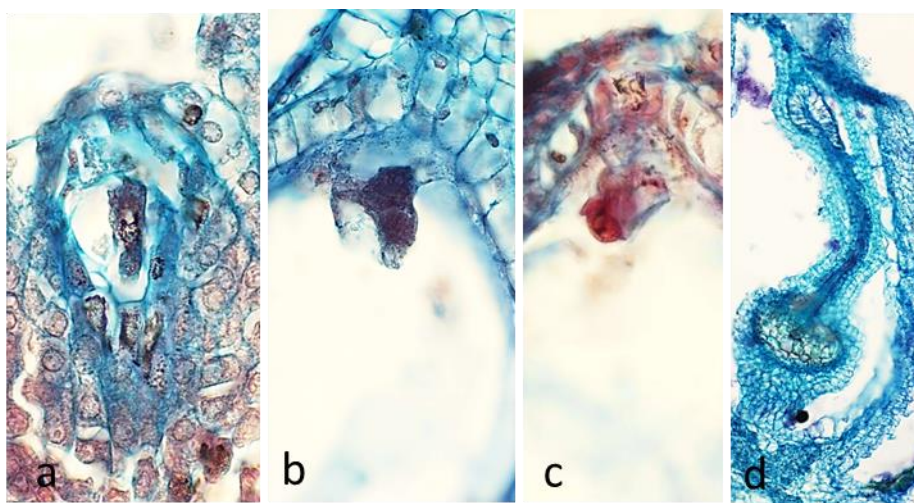


Fig. 5. Prawidłowy rozwój gametofitu żeńskiego, zapłodnienie i rozwój zarodka gryki zwyczajnej roku PA15 (a-c, g, h) i odmiany Panda (d-f) po usunięciu 50% kwiatów (a, b) 2-jądrowy woreczek zalążkowy - kolejne etapy, jądra zaznaczono strzałkami, (c-f) komórki 7-komórkowego woreczka zalążkowego - jądro wtórne (strzałka), komórka jajowa (gwiazdka), synergidy (trójkąt) (d-f kolejne stadia rozwojowe tego samego zalążka, antypody niewidoczne), (g) penetrująca łagiewka pyłkowa jedną synergidę (strzałka), (h) zarodek - stadium globularne.



Fot. 6. Degeneracja komórek woreczka zalążkowego i komórek jajowych odmiany Panda (a, c) i PA15 (b, d) po usunięciu 75% kwiatów. (a) 1-jądrowy woreczek zalążkowy, (b, c) aparat jajowy 7-komórkowego woreczka zalążkowego, (d) cały woreczek.

Analiza hormonalna

Analiza profilu hormonalnego została wykonana w pąkach kwiatowych, w pełni rozwiniętych i przekwitniętych kwiatach oraz liściach donorowych. Materiał został pobrany w pełni kwitnienia roślin. Analiza statystyczna wykazała istotne zróżnicowanie w zawartości badanych fitohormonów w zależności od genotypu i sposobu uprawy roślin. Zawartość hormonów w zależności od sposobu uprawy roślin w pąkach kwiatowych, otwartych i przekwitniętych kwiatach przedstawiono w Tabeli 3 (dla odmiany 'Panda') i Tabeli 4 (dla rodu PA15) oraz w liściach donorowych obu genotypów w Tabeli 5.

Hormony roślinne biorą udział w procesie kwitnienia. Auksyny inicjują przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej. Gibereliny odpowiadają za powstawanie pręcikowia. Cytokiny stymulują powstawanie kielicha i słupkowia. Kwas jasmonowy kontroluje różnicowanie się kwiatu (Bernier i in. 1988; Blazques 2000). W obu genotypach największe stężenia we wszystkich stadiach rozwojowych kwiatów wykryto dla nieaktywnej formy glikozydu kwasu abscysynowego (ABA-glc), kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz kwasu jasmonowego (JA). Można przypuszczać, że wysoka temperatura panująca w 2019 roku w czasie kwitnienia gryki mogła mieć istotny wpływ na zwiększenie zawartości głównie ABA i jasmonianów. Duże stężenia stwierdzono także w przypadku kwasu salicylowego (SA) i benzooesowego (BA). Epi-brasinolid występował w minimalnych stężeniach (z tego względu nie przedstawiono ich w tabelach). Niskie stężenia wykazano także dla kwasu indolilo-3-masłowego, co wskazuje, że główną auksyną w gryce jest IAA. Warto zwrócić uwagę, że najwięcej kwasu jasmonowego występowało w pąkach kwiatowych, co można rozumieć jako sygnał do wytworzenia wabiącego owady charakterystycznego zapachu. Podobnie jak w ubiegłym roku (2018), największe stężenie kwasu abscysynowego wykryto w kwiatach otwartych, co przypisano jego wyprzedzającej roli sygnałowej w procesach starzenia się kwiatów i ich odpadaniu, co następuje w późniejszej fazie rozwojowej (Aneja et al. 1999; Panavas et al. 1998). ABA pełni ponadto rolę cząsteczki sygnałowej w różnych fizjologicznych procesach, jak na przykład w spoczynku nasion czy w reakcji na

stresy suszy, zasolenia czy chłodu (Bonetta i McCourt 1998). Kwas abscysynowy może brać również udział w reakcji odpornościowej na patogeny (Mauch-Mani i Mauch 2005).

Zmiany hormonalne następujące w kolejnych fazach rozwojowych kwiatów przedstawiono w raporcie za rok 2018 oraz w publikacji Płazek i in. (2019). W tym przypadku skupiliśmy się głównie na powiązaniu zmian hormonalnych pod wpływem usuwania organów generatywnych i części liści donorowych z rozwojem embriologicznym.

Tabela 3. Zawartość hormonów [$\mu\text{mol g}^{-1}$ DW] w pąkach, kwiatach otwartych i przekwitniętych roślin gryki zwyczajnej odmiany Panda w uprawie jednopędowej (1P) lub po usunięciu 50% lub 75% kwiatów. Rośliny kontrolne były uprawiane standardowo. Hormony oznaczano w fazie pełnego kwitnienia.

Hormony	Pąki				Otwarte kwiaty				Przekwitnięte kwiaty			
	Kontrola	1P	50%	75%	Kontrola	1P	50%	75%	Kontrola	1P	50%	75%
IAA	173±18	77±6	110±10	110±9	91±8	73±7	69±6	71±6	287±26	267±24	133±12	134±12
IBA	0,61±0,05	0,65±0,05	0,46±0,04	0,63±0,06	0,76±0,06	0,84±0,07	0,54±0,05	0,71±0,07	0,81±0,07	0,99±0,09	0,72±0,06	0,71±0,06
GA akt.	5,84±0,42	4,47±0,40	6,22±0,52	4,63±0,39	6,22±0,59	6,87±0,58	5,65±0,57	5,60±0,48	6,15±0,57	10,85±0,99	8,67±0,82	10,26±0,1,1
GA n.akt.	3,74±0,31	6,81±0,74	5,34±0,52	3,63±0,36	5,92±0,63	1,24±0,12	4,49±0,50	6,21±0,55	3,91±0,42	7,61±0,71	4,95±0,51	6,90±0,62
CYT	3,58±0,31	2,53±0,21	5,09±0,45	3,29±0,31	3,72±0,34	3,46±0,32	4,16±0,41	3,83±0,32	3,22±0,35	4,39±0,38	5,01±0,46	3,27±0,32
ABA-glc	237±22	138±13	222±20	263±25	413±39	293±28	826±81	536±54	204±19	163±15	663±63	230±22
ABA	2,74±0,21	1,88±0,19	1,51±0,14	1,30±0,14	5,36±0,49	3,99±0,32	3,75±0,33	2,78±0,27	3,31±0,29	2,54±0,26	1,92±0,17	3,43±0,34
JA	80,42±7,01	80,40±0,76	34,61±3,20	53,36±5,01	14,43±1,42	20,37±2,04	9,67±0,91	9,04±0,90	46,91±4,05	48,99±4,12	15,50±1,40	25,53±2,61
JA-Met	1,44±0,14	1,02±0,11	0,39±0,05	0,46±0,05	0,55±0,06	0,64±0,06	0,23±0,03	0,35±0,04	1,06±0,09	0,83±0,08	0,34±0,03	0,39±0,03
SA	56,93±6,02	25,62±2,56	33,07±3,01	59,37±6,02	44,59±4,87	40,49±4,06	40,08±3,89	71,24±7,05	65,29±6,21	48,02±4,78	45,0±4,31	139±12
BA	29,80±2,01	66,00±6,26	43,10±4,11	45,31±4,23	21,55±2,01	27,43±2,36	30,05±3,01	26,90±2,48	24,68±2,48	36,72±3,76	34,91±3,02	22,43±2,01

IAA – kwas indolilo-3-octowy; IBA – kwas indolilo-3-masłowy; GA akt. – suma giberelin aktywnych (GA1, GA3, GA4, GA5, GA6, GA7); GA n. akt. – suma giberelin nieaktywnych (GA8, GA20); CYT – suma cytokinin (kinetyny, zeatyny, topoliny, N6-izopentenyloadeniny, N6-izopentenyloadenozyny); ABA-glc – glukozyd kwasu abscysynowego (ABA nieaktywny); ABA – kwas abscysynowy, aktywny; JA – kwas jasmonowy; JA-Met – ester metylowy kwasu jasmonowego; SA – kwas salicylowy, Epi-BR – *epi*-brasinolid; BA – kwas benzoesowy

Tabela 4. Zawartość hormonów [$\mu\text{mol g}^{-1}$ DW] w pąkach, kwiatach otwartych i przekwitniętych roślin gryki zwyczajnej rodu PA15 w uprawie jedнопędowej (1P) lub po usunięciu 50% lub 75% kwiatów. Rośliny kontrolne były uprawiane standardowo. Hormony oznaczano w fazie pełnego kwitnienia.

Hormony	Pąki				Otwarte kwiaty				Przekwitnięte kwiaty			
	Kontrola	1P	50%	75%	Kontrola	1P	50%	75%	Kontrola	1P	50%	75%
IAA	73,5 $\pm$ 7,1	124 $\pm$ 11	102 $\pm$ 10	149 $\pm$ 13	67,9 $\pm$ 6,2	81,7 $\pm$ 8,0	64,3 $\pm$ 6,1	47,2 $\pm$ 4,3	157 $\pm$ 15	189 $\pm$ 17	253 $\pm$ 21	66,1 $\pm$ 6,1
IBA	0,71 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,05
GA akt.	8,29 $\pm$ 0,79	8,14 $\pm$ 0,72	3,51 $\pm$ 0,30	8,50 $\pm$ 0,81	7,40 $\pm$ 0,72	6,45 $\pm$ 0,61	4,59 $\pm$ 0,47	8,67 $\pm$ 0,81	7,40 $\pm$ 0,73	11,1 $\pm$ 0,11	6,87 $\pm$ 0,65	15,1 $\pm$ 0,12
GA n.akt.	4,39 $\pm$ 0,39	11,30 $\pm$ 0,13	3,20 $\pm$ 0,34	3,07 $\pm$ 0,30	5,15 $\pm$ 0,51	2,38 $\pm$ 0,23	3,73 $\pm$ 0,32	5,72 $\pm$ 0,53	3,66 $\pm$ 0,31	7,83 $\pm$ 0,72	4,66 $\pm$ 0,43	4,19 $\pm$ 0,41
CYT	2,88 $\pm$ 0,25	8,93 $\pm$ 0,83	2,55 $\pm$ 0,25	3,91 $\pm$ 0,36	3,78 $\pm$ 0,35	3,92 $\pm$ 0,32	2,10 $\pm$ 0,19	3,36 $\pm$ 0,32	4,09 $\pm$ 0,37	4,43 $\pm$ 0,42	4,49 $\pm$ 0,41	2,40 $\pm$ 0,21
ABA-glc	232 $\pm$ 21	182 $\pm$ 17	109 $\pm$ 9	389 $\pm$ 37	282 $\pm$ 26	243 $\pm$ 22	585 $\pm$ 59	436 $\pm$ 49	168 $\pm$ 14	315 $\pm$ 29	262 $\pm$ 25	299 $\pm$ 28
ABA	2,16 $\pm$ 0,19	1,55 $\pm$ 0,12	2,92 $\pm$ 0,25	3,50 $\pm$ 0,31	4,04 $\pm$ 0,36	2,69 $\pm$ 0,25	5,63 $\pm$ 0,52	3,53 $\pm$ 0,29	3,45 $\pm$ 0,33	1,80 $\pm$ 0,17	4,09 $\pm$ 0,39	2,52 $\pm$ 0,26
JA	51,42 $\pm$ 5,07	94,61 $\pm$ 9,11	151 $\pm$ 14	30,82 $\pm$ 3,98	24,12 $\pm$ 2,95	54,14 $\pm$ 5,12	30,71 $\pm$ 2,76	6,46 $\pm$ 0,68	34,94 $\pm$ 3,32	56,22 $\pm$ 5,21	58,82 $\pm$ 5,76	59,15 $\pm$ 5,78
JA-Met	0,84 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,12	1,09 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,02	1,45 $\pm$ 0,13	2,04 $\pm$ 0,19	0,42 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,07	0,84 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,04
SA	22,6 $\pm$ 2,1	77,8 $\pm$ 7,2	86,8 $\pm$ 8,3	41,9 $\pm$ 3,9	18,8 $\pm$ 1,8	62,4 $\pm$ 6,1	105 $\pm$ 9,5	65,1 $\pm$ 5,8	33,2 $\pm$ 3,2	96,7 $\pm$ 9,3	124 $\pm$ 10,2	31,7 $\pm$ 2,8
BA	31,3 $\pm$ 2,8	68,4 $\pm$ 5,5	62,7 $\pm$ 5,2	28,6 $\pm$ 1,9	21,2 $\pm$ 1,6	33,2 $\pm$ 2,8	41,8 $\pm$ 3,8	27,6 $\pm$ 2,4	16,2 $\pm$ 1,1	25,9 $\pm$ 2,3	38,4 $\pm$ 2,9	36,4 $\pm$ 1,8

Oznaczenia, jak w Tabeli 3.

Tabela 5. Zawartość hormonów [$\mu\text{mol g}^{-1}$ DW] w liściach donorowych gryki zwyczajnej odmiany 'Panda' i rodu PA15 w uprawie jedнопędowej (1P) lub po usunięciu 50% lub 75% kwiatów. Rośliny kontrolne były uprawiane standardowo. Hormony oznaczano w fazie pełnego kwitnienia.

Hormony	Panda				PA15			
	Kontrola	1P	50%	75%	Kontrola	1P	50%	75%
IAA	18,88 $\pm$ 1,12	24,68 $\pm$ 1,97	26,12 $\pm$ 2,43	43,12 $\pm$ 3,56	46,41 $\pm$ 3,75	33,42 $\pm$ 3,21	45,01 $\pm$ 3,67	28,95 $\pm$ 2,45
IBA	0,88 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,06	1,56 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,73
GA akt.	3,48 $\pm$ 0,24	4,06 $\pm$ 0,09	6,55 $\pm$ 0,54	4,18 $\pm$ 0,05	5,14 $\pm$ 0,19	9,03 $\pm$ 0,14	6,56 $\pm$ 0,24	10,09 $\pm$ 0,17
GA n.akt.	8.89 $\pm$ 1,09	8,53 $\pm$ 1,06	2,56 $\pm$ 0,23	1,65 $\pm$ 0,07	7,03 $\pm$ 0,06	5,47 $\pm$ 0,11	6,11 $\pm$ 0,11	2,98 $\pm$ 0,08
CYT	1,16 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,67	1,04 $\pm$ 0,09	1,36 $\pm$ 0,06	1,27 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,01
ABA-glc	56,03 $\pm$ 5,31	29,00 $\pm$ 2,56	81,43 $\pm$ 8,32	136,1 $\pm$ 12,8	120,8 $\pm$ 11,7	122,2 $\pm$ 11,8	143,2 $\pm$ 13,0	175,2 $\pm$ 16,8
ABA	1,72 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,08	1,52 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,06	2,32 $\pm$ 0,15	1,67 $\pm$ 0,07
JA	135,6 $\pm$ 12,5	83,65 $\pm$ 8,54	150,6 $\pm$ 13,2	64,78 $\pm$ 5,97	83,27 $\pm$ 7,32	75,56 $\pm$ 6,98	145,5 $\pm$ 13,76	147,5 $\pm$ 14,9
JA-Met	4,20 $\pm$ 0,09	6,45 $\pm$ 0,97	3,03 $\pm$ 0,05	3,00 $\pm$ 0,09	3,53 $\pm$ 0,12	3,48 $\pm$ 0,21	1,55 $\pm$ 0,09	3,69 $\pm$ 0,84
SA	81,20 $\pm$ 7,96	30,57 $\pm$ 3,87	105,9 $\pm$ 9,76	86,96 $\pm$ 7,32	70,37 $\pm$ 7,02	80,08 $\pm$ 7,43	52,75 $\pm$ 5,03	61,28 $\pm$ 5,32
BA	17,00 $\pm$ 2,45	13,75 $\pm$ 1,35	85,57 $\pm$ 7,65	103,4 $\pm$ 9,23	43,72 $\pm$ 4,11	31,28 $\pm$ 2,78	58,61 $\pm$ 5,08	37,12 $\pm$ 3,37

Oznaczenia jak w Tabeli 3.

Jak przedstawiono w Tabeli 2, w roślinach rodu PA15, z których usunięto 50% kwiatów, wykryto najmniejszy procent zdegenerowanych woreczków zalążkowych (o 20% mniej niż w roślinach kontrolnych). W pąkach kwiatowych tych roślin odnotowano istotnie mniej aktywnych giberelin, cytokinin i ABA-glc, zaś istotnie więcej JA, i SA w stosunku roślin kontrolnych, jak i roślin inaczej traktowanych. W otwartych kwiatach zdolnych do zapłodnienia w roślinach z 50-procentowym usunięciem kwiatów, zanotowano również mniej GA-aktywnych, cytokinin, zaś istotnie więcej obu form ABA, JA, SA i BA niż u roślin kontrolnych. Zwłaszcza stężenia ABA-glc, SA i BA były dużo wyższe. Podobne różnice obserwowaliśmy w kwiatach przekwitniętych. Dodatkowo, w tych kwiatach wykryliśmy więcej IAA. Niewykluczone, że auksyna ta podtrzymuje rozwój zarodków, co mogło mieć znaczenie dla większego plonu nasion w przypadku tych roślin.

Kwas salicylowy odgrywa dużą rolę w procesie kwitnienia i przywabiania owadów, podobnie jak kwas jasmonowy. Ponadto oba te hormony biorą udział w procesach obronnych roślin w przypadku ataku patogenów (Thaler i in. 2002). Kwas jasmonowy jest niezbędny także do tworzenia komórki jajowej, a jego brak jest charakterystyczny dla sterylnych kwiatów (Wang and Irving 2011). W procesie kwitnienia przypisuje się dużą rolę takim hormonom jak gibereliny, brassinosteroidy czy kwas abscysynowy. Zazwyczaj uważa się, że ABA, jako antagonist giberelin, hamuje proces kwitnienia (Domagalska i in. 2010), stąd też dziwi fakt, że w kwiatach, które najlepiej zawiązywały nasiona, właśnie tego hormonu było więcej niż w kwiatach roślin o większym stopniu degeneracji woreczków zalążkowych. Stosunek GA do aktywnej formy ABA w roślinach, z których usunięto 50% kwiatów wynosił w pąkach kwiatowych 1,2; w otwartych kwiatach 0,82, a w przekwitniętych kwiatach 1,68. Wyniki te oznaczają, że ważniejsza jest proporcja pomiędzy giberelinami a kwasem abscysynowym niż bezwzględne wartości stężeń tych obu hormonów. Z drugiej strony, w roślinach kontrolnych stosunek ten był zdecydowanie wyższy, (3,84; 1,8; 2,14 odpowiednio), świadczący o znacznej przewadze giberelin nad ABA, a jednocześnie rośliny te charakteryzowały się większym stopniem degeneracji woreczków zalążkowych. Jak już zaznaczono powyżej, w kwiatach gryki wykryto bardzo niskie stężenia *epi*-brassinolidu. Można zatem sądzić, że u tego gatunku brassinolidy nie odgrywają kluczowej roli w procesie kwitnienia.

Wysokie stężenie kwasu salicylowego wskazuje również na jego ważną rolę w procesie kwitnienia roślin. Kontroluje on, podobnie jak JA proces przywabiania owadów w fazie kwitnienia, jednakże o ile JA nadaje odpowiedni zapach kwiatom, o tyle SA może zwiększać temperaturę kwiatów w celu uwolnienia związków lotnych (Raskin 1992). Prekursorem kwasu salicylowego jest kwas benzoesowy, stąd też nic dziwnego, że stężenie BA w kwiatach jest wysokie, co ma bezpośrednie przełożenie na wysoką zawartość SA. Trzeba również pamiętać, że większość hormonów stymuluje powstawanie kwiatów jeszcze w fazie wegetatywnej, a zatem obecność hormonów w kwiatach może nie dawać pełnego obrazu roli poszczególnych hormonów w rozwoju embriologicznym.

Należy zaznaczyć, że wszystkie powyższe obserwacje dotyczyły jedynie składu hormonalnego w kwiatach roślin rodu PA15 po usunięciu 50% kwiatów, natomiast w tak traktowanych roślinach odmiany 'Panda' tego typu zmian nie obserwowano.

Analizując z kolei skład hormonalny w kwiatach roślin PA15, z których usunięto 75% kwiatów, bowiem właśnie te rośliny wykazywały najwięcej przypadków wadliwego rozwoju woreczków zalążkowych, stwierdzono w pąkach najwięcej IAA i obu form ABA. W otwartych kwiatach zanotowano najmniej IAA i jasmonianów, ale najwięcej aktywnych giberelin. Przekwitające kwiaty miały również mniej IAA i CYT, za to więcej aktywnych giberelin. U odmiany 'Panda' w tak traktowanych roślinach skład hormonalny w otwartych kwiatach różnił się od kontroli istotnie mniejszą zawartością ABA wolnego i istotnie większym stężeniem SA, a kwiatach przekwitających także większą zawartością aktywnych giberelin, ABA-glc i SA. Co ciekawe, pomimo większego procentu

nieprawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych u PA15 po usunięciu 75% kwiatów, stwierdzono większą efektywność zawiązywania nasion niż u roślin po usunięciu 50% kwiatów (Tabela 8). U odmiany Panda rośliny z usuniętymi kwiatami w 75% wykazały także dużo większy odsetek wadliwych woreczków zalążkowych niż u roślin inaczej traktowanych, ale efektywność zawiązywania nasion była podobna do roślin, z których usunięto 50% kwiatów. Niewykluczone, że efekt ten był spowodowany większym stężeniem giberelin i że te hormony wykazują większą niż auksyny efektywność w podtrzymywaniu przy życiu powstających po zapłodnieniu zarodków.

Oba badane genotypy różniły się w reakcji na usuwanie organów w poziomie hormonów w liściach. Stężenie IAA u odmiany Panda po usunięciu 75% kwiatów istotnie wzrosło, a u PA15 zmniejszyło się w roślinach tak uprawianych, jak i w uprawie jednopędowej. Zawartość aktywnych giberelin zwiększyła się u odmiany Panda po usunięciu 50% kwiatów, a u PA15 w uprawie jednopędowej i po usunięciu 75% kwiatów. Oba genotypy zareagowały istotnym zwiększeniem zawartości ABA-glc po usunięciu kwiatów, i spadkiem zawartości aktywnej formy ABA w uprawie jednopędowej. W liściach odmiany Panda zanotowano istotny wzrost stężenia SA po usunięciu 50% kwiatów i istotny spadek w uprawie jednopędowej, natomiast w liściach PA15 nie obserwowano większych zmian w poziomie tego hormonu. Warto zwrócić uwagę na wzrost JA w obu genotypach po usunięciu kwiatów. Tej reakcji należało się spodziewać z uwagi na rolę kwasu jasmonowego w reakcji na zranienia tkanek, jednakże w przypadku odmiany Panda usunięcie 75% kwiatów wręcz obniżyło zawartość tego hormonu.

Analizując głównie stężenie hormonów w liściach PA15 po usunięciu 50% kwiatów, nie znaleziono szczególnych zmian odróżniających ten genotyp od odmiany Panda, w którym taki zabieg nie spowodował redukcji odsetka zdegenerowanych woreczków zalążkowych.

Analiza kwitnienia i parametrów plonu

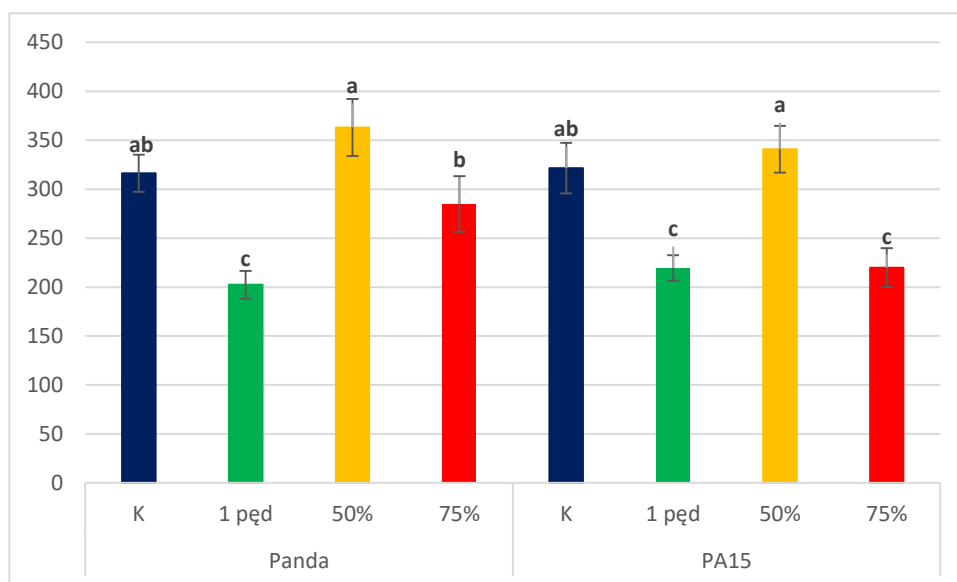
W czasie pełnego kwitnienia liczono kwiaty na roślinach z każdego traktowania. Na produkcję kwiatów wpływało głównie traktowanie roślin (Tabela 6).

Porównanie liczby kwiatów na roślinach kontrolnych i jednopędowych wskazuje, że u obu odmian na pędzie głównym zawiązuje się około 2/3 liczby wszystkich kwiatów, zaś na wszystkich bocznych pędach łącznie 1/3 tej liczby (Wykres 1).

Jak wynika z Wykresu 1. usuwanie kwiatów powodowało kompensacyjną produkcję następnych kwiatów. W roślinach Pandy 50% usunięcie kwiatów wywołało zwiększenie ich liczby o 130%, a na roślinach, z których usunięto 75% kwiatów wzrost liczebności nastąpił o 260% (Tabela 7). Z kolei w przypadku rodu PA15, usunięcie 50% kwiatów stymulowało zwiększenie liczby kwiatów o 100%, zaś usunięcie 75% – o 170%. Potencjalna liczba kwiatów została przeliczana w następujący sposób: w przypadku usunięcia połowy kwiatów obserwowaną liczbę pomnożono przez 2, zaś w przypadku usunięcia $\frac{3}{4}$ kwiatów pomnożono przez 4. Taka kalkulacja pozwoliła wyliczyć, ile teoretycznie kwiatów roślina musiałaby wyprodukować, by po utracie 50% i 75% kwiatów na roślinach pozostała przedstawiona na wykresie liczba kwiatów. Można zatem stwierdzić, że u obydwu odmian kompensacyjne wytwarzanie nowych kwiatów było wyraźnie nadmiarowe (zwłaszcza u roślin z połową usuniętych kwiatów) mimo, iż liczba kwiatów na roślinach „3/4” była niższa aniżeli w kontroli.

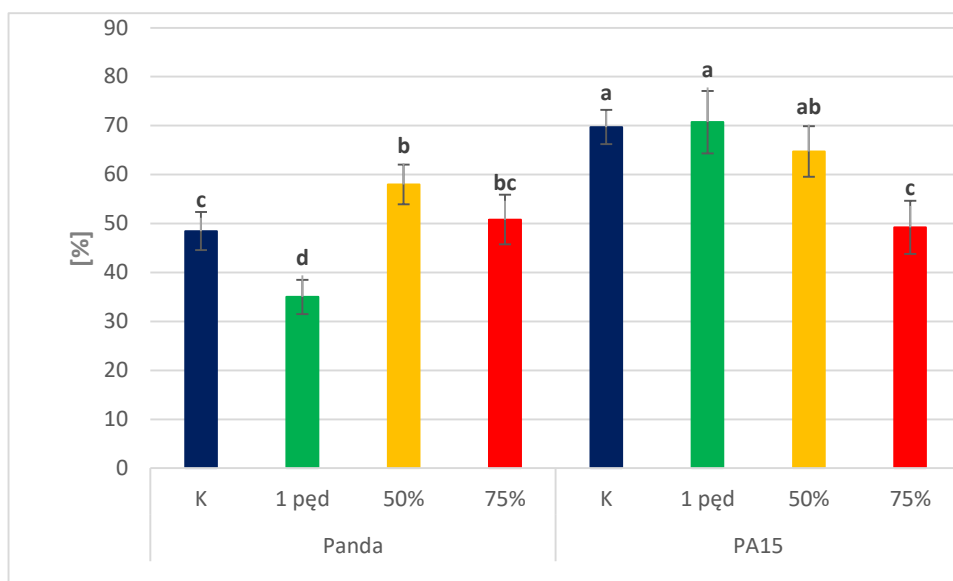
Tabela 6. Analiza wariancji wpływu sposobu uprawy (jednopędowa, usunięcie 50 lub 75% kwiatów, kontrola) roślin gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 na produkcję kwiatów, aborcję kwiatów, oraz parametrów plonu nasion w przeliczeniu na jedną roślinę: liczbę nasion i masę nasion pełnych, procent nasion pustych, masę tysiąca nasion. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; ns – nie istotne

Efekt	Liczba kwiatów	%aborcji	Liczba nasion pełnych	Efektywność plonowania	% nasion pustych	Masa nasion dojrzałych	Masa tysiąca nasion
Linia	ns	***	***	ns	*	***	***
Traktowanie	***	ns	**	ns	***	***	***
Linia x Traktowanie	ns	ns	***	*	ns	***	***



Wykres 1. Średnia liczba kwiatów produkowana przez jedną roślinę obserwowana w pełni kwitnienia gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w przeliczeniu na jedną roślinę w uprawie jednopędowej, po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie ($n=20$) $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Przeprowadzone badania jeszcze raz potwierdziły nasze wieloletnie spostrzeżenia, że pomiędzy liczbą kwiatów a ich aborcją istnieje silna korelacja: w tym eksperymencie wynosiła ona $r=0,5$ (przy $p < 0,05$), co oznacza, że im więcej roślina wyprodukuje kwiatów, tym więcej z nich zostanie odrzuconych. Z Tabeli 6. wynika, że na aborcję kwiatów ma przede wszystkim wpływ genotyp rośliny. Naszym zdaniem rośliny gryki mają zakodowany pewien limit kwiatów, które powstaną. Powyżej tego limitu roślina nie przekaże swoich „środków” (asymilatów) na ich produkcję. Procent aborcji kwiatów dla poszczególnych traktowań przedstawiono na Wykresie 2.



Wykres 2. Procent aborcji kwiatów gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jednopędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50% i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie ($n=20$) $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Wyższy procent aborcji kwiatów charakteryzuje generalnie ród PA15. Usunięcie bocznych pędów skutkowało obniżeniem procentu aborcji u odmiany Panda. U tej odmiany w roślinach, z których usunięto 50%, notowano rekompensacyjne zawiązanie za dużej liczby kwiatów, co skutkowało wyższą ich aborcją. Efektu tego nie obserwuje się u roślin PA15.

U obu odmian w roślinach z usuniętymi w $\frac{3}{4}$ kwiatów jedynie częściowa rekompensata utraconej liczby kwiatów spowodowała, że procent aborcji był niższy niż w obiektach z usuniętymi w 50% kwiatami, a u rodu PA15 procent ten był nawet niższy od kontroli.

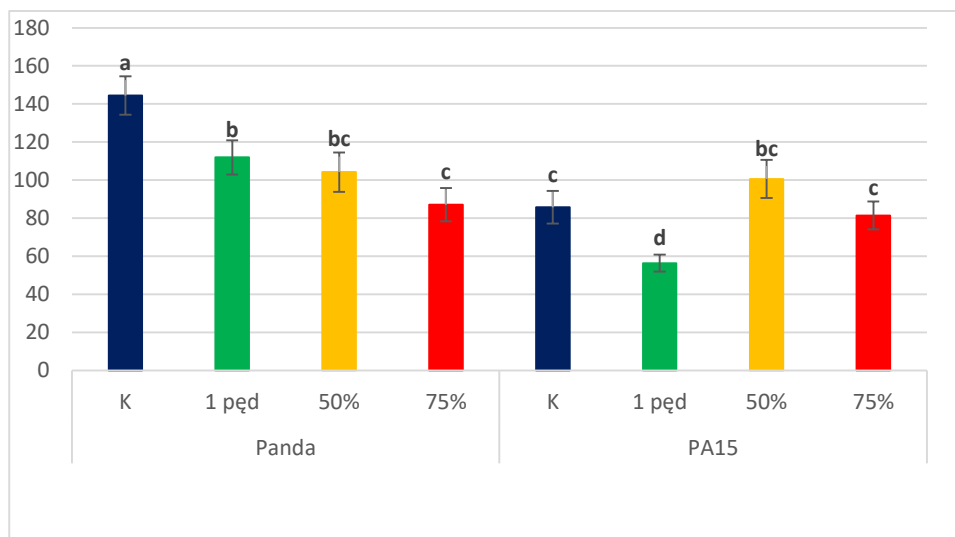
Tabela 7. Obserwowana i potencjalna liczba kwiatów ($n=20$) produkowana średnio przez jedną roślinę gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie kontrolnej, jednopędowej oraz po usunięciu 50 i 75% kwiatów.

Genotyp	Traktowanie	Obserwowana liczba kwiatów	Potencjalna liczba kwiatów
Panda	Kontrola	316	316
	Jeden pęd	202	316
	50% kwiatów	363	726
	75% kwiatów	284	1136
PA15	Kontrola	321	321
	Jeden pęd	219	321
	50% kwiatów	340	680
	75% kwiatów	219	876

Produkcja dojrzałych nasion

Na uzyskaną liczbę dojrzałych nasion w przeliczeniu na jedną roślinę miał wpływ genotyp roślin, traktowanie oraz interakcja pomiędzy tymi dwoma czynnikami (Tabela 6). Jak wynika z Wykresu 3 odmiana Panda jest bardziej plenna niż ród PA15. Liczba nasion uzyskana z roślin kontrolnych odmiany Panda była prawie dwukrotnie większa od liczby nasion roślin kontrolnych rodu PA15. Fakt ten potwierdza tezę, że produktywność nasion jest cechą istotnie związaną z genotypem rośliny. Zmniejszanie liczby kwiatów w przypadku odmiany Panda nie zwiększyło plonu nasion, natomiast u rodu PA15, 50% usunięcie kwiatów zwiększyło nieznacznie plon nasion. Usuwanie konkurencji o asymilaty pomiędzy nasionami a wciąż powstającymi kwiatami miało natomiast znaczenie dla efektywności plonowania, to jest dla liczby zawiązanych dojrzałych nasion w stosunku do liczby kwiatów (Tabela 8). Jak wynika z Tabeli 6. efektywność plonowania była wynikiem interakcji pomiędzy genotypem rośliny a sposobem jej uprawy (traktowaniem). Dane przedstawione w Tabeli 4 wskazują, że liczba degeneracji woreczków zalążkowych u rodu PA15 była zdecydowanie większa niż u odmiany Panda, co miało istotny wpływ na efektywność plonowania, która u tej odmiany była większa. W przypadku odmiany Panda, uprawa jednopędowa zwiększyła istotnie efektywność zawiązywania nasion, natomiast w przypadku rodu PA15 efektywność zawiązywania nasion wzrosła u roślin, z których usunięto 75% kwiatów. Wzrost plonowania w powyższych przypadkach niebicie dowodzi, że zmniejszenie konkurencji o asymilaty może mieć wpływ na mniejszy procent degeneracji woreczków zalążkowych.

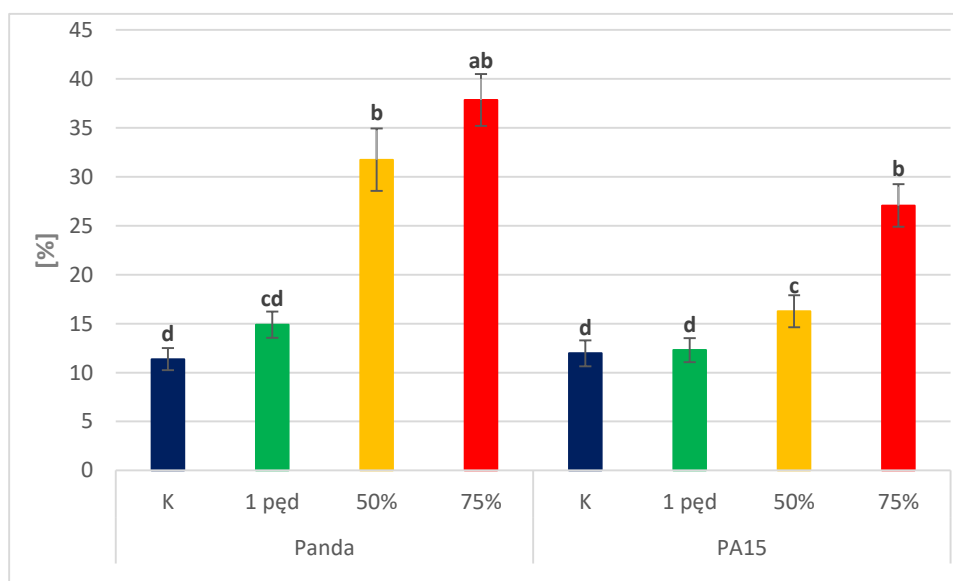
Procent aborcji kwiatów korelował również z liczbą nasion dojrzałych ($r = -0,607$; $p < 0,05$), co oznacza, że im większy stopień odrzuconych przez roślinę kwiatów tym mniejszy plon nasion. Procent nasion pustych zależał od genotypu rośliny oraz traktowania (Tabela 2).



Wykres 3. Średnia liczba nasion dojrzałych uzyskana z jednej rośliny gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jednopędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie ($n=20$) $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Tabela 8. Procent zawiązanych nasion w stosunku do wyprodukowanych kwiatów gryki zwyczajnej (tj. efektywność plonowania) rośliny odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie kontrolnej, jedнопędowej oraz po usunięciu 50 i 75% kwiatów. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Genotyp	Traktowanie	Procent zawiązanych nasion w stosunku do liczby wyprodukowanych kwiatów
Panda	Kontrola	46,0 ^{bc}
	Jeden pęd	53,3 ^a
	50% kwiatów	31,7 ^d
	75% kwiatów	37,3 ^{cd}
PA15	Kontrola	28,5 ^e
	Jeden pęd	26,8 ^e
	50% kwiatów	25,2 ^e
	75% kwiatów	34,3 ^d



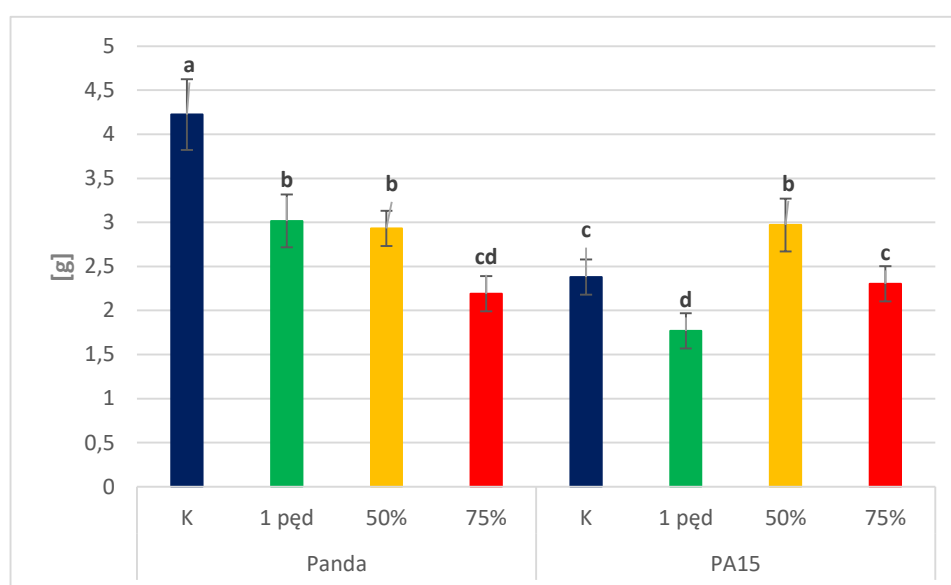
Wykres 4. Procent pustych [%] nasion w przeliczeniu na jedną roślinę gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jedнопędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Jak wynika z Wykresu 4. usuwanie kwiatów, istotnie zwiększyło procent pustych nasion u obu badanych genotypów. Pomimo, że procent pustych nasion nie korelował istotnie z liczbą pełnych nasion, to korelował istotnie ujemnie z masą jednego dojrzałego nasiona ($r = -0,857$; $p < 0,05$) oraz z masą tysiąca nasion ($r = -0,272$; $p < 0,05$). Wyniki te jednoznacznie wskazują na fakt, że zawiązywanie nasion, choć później nie wypełnionych obniża masę nasion dojrzałych. Można zatem sądzić, że punktem krytycznym dla plonu nasion jest sam moment kwitnienia i zapłodnienia. Nadprodukcja kwiatów oraz

tworzenie zarodków jest procesem wyczerpującym zapasy rośliny. Niewypełnianie wszystkich nasion już nie zrekompensuje tych strat. Wykształcanie pustych nasion jest więc, obok aborcji kwiatów, inną formą regulacji plonowania w sytuacji, kiedy roślina wyprodukowała, (z powodu działań eksperymentatora), za dużą liczbę kwiatów.

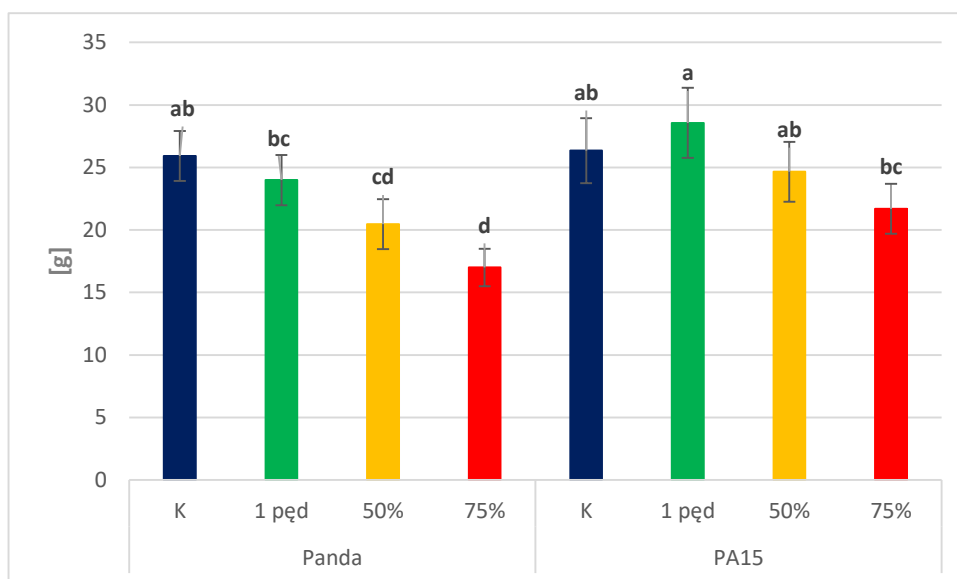
Masa nasion

Na masę nasion zebranych z jednej rośliny, jak też na MTN wpływał genotyp rośliny, traktowanie, czyli sposób uprawy oraz interakcja tych czynników (Tabela 2). W przypadku odmiany Panda największą masę miały nasiona zebrane z roślin kontrolnych (Wykres 5). Usuwanie 50% kwiatów oraz w uprawie jednopędowej masa zebranych nasion była podobna i istotnie mniejsza od masy nasion z roślin kontrolnych. Najmniejszą masę nasion uzyskano z roślin, w których usunięto 75% kwiatów. W przypadku rodu PA15 największą masę nasion uzyskano z roślin, z których usunięto 50% kwiatów. Usunięcie 75% kwiatów nie wpłynęło na ten parametr w porównaniu do roślin kontrolnych, natomiast najmniejszą masę nasion uzyskano z roślin w uprawie jednopędowej.



Wykres 5. Średnia masa [g] nasion z jednej rośliny gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jednopędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie ($n=20$) $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Z kolei MTN w przypadku PA15 była największa właśnie z roślin uprawianych na jeden pęd, aczkolwiek wartość ta nie różniła się istotnie od MTN uzyskanej z roślin kontrolnych i z usuniętymi w 50% kwiatami. Dopiero usunięcie 75% istotnie obniżyło wartość tego parametru (Wykres 6). Masa tysiąca nasion odmiany Panda była największa w przypadku roślin kontrolnych oraz uprawianych na jeden pęd. Usuwanie kwiatów obniżało wartość tego parametru.



Wykres 6. Średnia masa tysiąca nasion (MTN) [g] uzyskanych z roślin gryki zwyczajnej odmiany Panda i rodu PA15 w uprawie jednopędowej i po sukcesywnym usuwaniu 50 i 75% kwiatów. K – kontrola. Na wykresie przedstawiono średnie ($n=20$) $\pm$ BS. Różnice między średnimi zaznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie (wielokrotny test Duncana; $p < 0,05$).

Halbrecq et al. (2005) wykonali badania polegające na defoliacji (częściowej i całkowitej) oraz częściowe usunięcie kwiatostanów gryki z głównego pędu, aby zmodyfikować dostępność asymilatów i zmniejszyć konkurencję między nasionami. We wszystkich przypadkach, bez względu na postępowanie, obserwowali drastyczne zmniejszenie liczby ziaren w stosunku do liczby utworzonych kwiatów, przy czym zbiór nasion był bardzo niski, około 20–30%. Autorzy ci stwierdzili, że krytyczny etap zawiązywania nasion następuje tuż po kwitnieniu i nie ma na niego wpływu zmiana relacji pomiędzy donorem a akceptorem ze względu na defoliację lub usuwanie części kwiatostanów. Drastyczne ograniczenie konkurencji między kwiatostanami i nasionami (poprzez częściowe usunięcie kwiatostanów) ma jedynie znikomy wpływ na końcowy plon ziarna na roślinę, co wskazuje na silną kompensację przez pozostałe ziarna. W naszych badaniach wykazaliśmy, że jedynie usunięcie 50% kwiatów u rodu PA15 pozwoliło na zwiększenie plonu nasion, zaś u odmiany Panda tego efektu nie obserwowaliśmy. W pozostałych przypadkach usuwanie kwiatów zmniejszyło plon, lub też nie zmieniało go w porównaniu do kontroli.

Taylor i Obendorf (2001) twierdzą, że słabe plonowanie nasion wynika z braku prawidłowo wykształconych zalążków i brakiem zapłodnienia. Autorzy ci twierdzą, że na brak zapłodnienia wpływa także zróżnicowanie w żywotności i jakości mikrospor. Z naszych badań wynika, że żywotność pyłku obu badanych genotypów jest wysoka, a usuwanie kwiatów zwiększa wręcz żywotność mikrospor.

Wczesna aborcja kwiatów występuje podczas całego okresu kwitnienia a stopień aborcji zależy od wielu czynników. U gryki okres rozwoju wegetatywnego przypada na okres formowania się organów generatywnych. Powstawanie organów generatywnych zbiega się z intensywnym kwitnieniem i powstawaniem nasion, co skutkuje silną konkurencją o asymilaty. Zdaniem Halbrecq i in. (2005), gdy rośliny osiągną maksymalny rozwój wegetatywny, konkurencja o asymilaty maleje. Asymilaty mogą być zatem lokowane głównie w organach generatywnych. Według tych autorów w tym czasie powstaje więcej kwiatów i nasion a stopień aborcji maleje i zmniejsza się konkurencja o asymilaty. Nasze badania nie potwierdziły tego wyniku. Nasze obserwacje dowodzą, że zwiększona liczba kwiatów koreluje z aborcją, czyli zwiększona liczba kwiatów nie daje przełożenia na liczbę osadzanych nasion, bowiem zwiększa się jednocześnie aborcja kwiatów. W poprzednich badaniach obserwowaliśmy pewien procent

„zagłodzonych” zarodków, a zatem konkurencja o asymilaty pomiędzy zawiązanymi nasionami a wciąż powstającymi kwiatami wciąż trwa (Słomka i in. 2017).

Jak już zauważyliśmy, roślina zdaje się osiąga pewien limit produkcji kwiatów i trudno ten limit zmienić. Halbrech i współautorzy (2005) zauważyli też, że aborcja dotyczy głównie kwiaty z wyższych pięt, czyli powstające w późniejszej fazie kwitnienia, w stosunku do kwiatów położonych niżej tj. wcześniej wyprodukowanych. W naszych badaniach, uprawa jednopędowa u PA15 nie zmieniła stopnia aborcji kwiatów w porównaniu do kontroli, natomiast w przypadku odmiany Panda obserwowaliśmy na jednym pędzie zdecydowanie mniejszy stopień aborcji. Sugawara (1973) i Asako i in. (1980) stwierdzili, że kwiaty powstałe wcześniej mają większe szanse na zawiązanie nasion niż kwiaty powstałe w późniejszej fazie kwitnienia. Z naszych wcześniejszych badań wynika, że skład nektaru jest bogatszy w cukry w kwiatach wcześniejszych, niż w kwiatach powstałych później. Prawdopodobnie ten czynnik ma niebagatelny wpływ na oblot owadów zapylających, co bezpośrednio przekłada się na zawiązywanie nasion. Taylor i Obendorf (2001) donoszą, że we wcześniejszej fazie kwitnienia woreczki zalążkowe są lepiej rozwinięte.

Podsumowanie - postulowane mechanizmy regulacji plonu nasion u roślin gryki

W wyniku utraty części kwiatów, z przyczyn naturalnych lub w wyniku działań eksperymentatora, roślina uruchamia procesy rekompensacyjne:

- Zwiększa efektywność zapylenia poprzez zmniejszenie odsetka zdegenerowanych ziaren pyłku,
- Wytwarza dodatkową liczbę kwiatów,
- Czasami może się zdarzyć, że nowa liczba kwiatów jest „nadmiarowa”,
- Kiedy liczba kwiatów okazuje się za wysoka, roślina dokonuje aborcji części z nich,
- Kiedy ta regulacja jest niewystarczająca, roślina zwiększa odsetek pustych nasion,
- Kiedy poprzednie mechanizmy regulacyjne okazują się niewystarczające, roślina ogranicza ilość materiałów zapasowych gromadzonych w ziarnie, przez co zmniejsza się masa 1000 nasion.
- Punktem krytycznym dla plonu nasion jest sam moment kwitnienia i zapłodnienia. Nadprodukcja kwiatów oraz tworzenie zarodków jest procesem wyczerpującym zapasy rośliny. Niewypełnianie wszystkich nasion już nie rekompensuje tych strat. Wykształcanie pustych nasion jest więc, obok aborcji kwiatów, inną formą regulacji plonowania w sytuacji, kiedy roślina wyprodukowała, (z powodu działań eksperymentatora), za dużą liczbę kwiatów.
- Usunięcie 50% kwiatów istotnie obniża procent wadliwie rozwiniętych woreczków zalążkowych, co ma bezpośredni wpływ na zwiększenie plonu dojrzałych nasion. Efekt ten obserwowano jednak tylko u rodu PA15.
- Większy plon nasion uzyskany z roślin rodu PA15 po usunięciu 50% kwiatów można przypisać większemu stężeniu w kwiatach kwasu salicylowego i jego prekursora – kwasu benzoesowego, oraz jasmonowego, odgrywających rolę przywabiającą owady zapylające. W kwiatach tych stwierdzono również większą zawartość auksyny IAA, i co interesujące, mniejszą zawartość giberelin.
- Analiza składu hormonalnego w kwiatach sugeruje, że dla plonu dojrzałych nasion ważny jest stosunek zawartości giberelin do kwasu abscysynowego, a nie bezwzględne wartości tych obu hormonów.
- Większa zawartość giberelin zwiększa efektywność plonowania, tj. procent kwiatów zapłodnionych i wydających plon.

Literatura:

1. Aneja, M. Gianfagna, T. Ng, E. 1999. The roles of abscisic acid and ethylene in the abscission and senescence of Cocoa flowers. *Plant Growth Reg.* 27, 149–155.

2. Asako Y., Ujihara A., Matano T. 1980. Relation between the position of flowers and their flowering of fruiting in common buckwheat. *Hokuriku Crop Sci.* 15, 27-30.
3. Bernier G., Havelange, A., Houssa C., Petitjean, A. Lejeune P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 1993, 5, 1147–1155
4. Blázquez, M. A. (2000). Flower development pathways. *Journal of Cell Science*, 113(20), 3547–3548.
5. Bonetta D., McCourt P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.* 3, 231–235.
6. Cawoy, V.; Lutts, S.; Ledent, J.-F.; Kinet, J.-M. Resource availability regulates reproductive meristem activity, developmental of reproductive structures and seed set in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiol. Plant.* 2007, 131, 341–453.
7. Domagalska M.A., Sarnowska E., Nagy F., Davis S.J. 2010. Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 5 (11) e14012.
8. Halbrech, B., Romedenne, P., & Ledent, J. F. 2005. Evolution of flowering, ripening and seed set in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): quantitative analysis. *European Journal of Agronomy*, 23(3), 209–224.
9. Mauch-Mani, B. Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current opinion in plant biology* 8(4), 409-414.
10. Płazek A., Słomka A., Kopeć P., Dziurka M., Hornyák M., Sychta K., Pastuszak J., Dubert F. 2019. Effects of high temperature on embryological development and hormone profile in flowers and leaves of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Inter. J. Mol. Sci.* 20, 1705; doi:10.3390/ijms20071705
11. Raskin I. 1992. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99, 799–803.
12. Slawinska, J.; Obendorf, R.L. Buckwheat seed set in planta and during in vitro inflorescence culture: Evaluation of temperature and water deficit stress. *Seed Sci. Res.* 2001, 11, 223–233.
13. Słomka, A.; Michno, K.; Dubert, F.; Dziurka, M.; Kopeć, P.; Płazek, A. Embryological background of low seed set in distylous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with biased morph ratios, and biostimulant-induced improvement of it. *Crop Past. Sci.* 2017, 68, 680–690.
14. Sugawara K. 1973. Study on buckwheat. *Ann. Rep. Fac. Edu. Iwate Univ.* 33, 1–96.
15. Taylor, D.P., Obendorf, R.L. 2001. Quantitative assessment of some factors limiting seed set in buckwheat. *Crop Sci.*, 41, 1792–1799.
16. Thaler, J. S., Karban, R., Ullman, D. E., Boege, K., Bostock, R. M. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia*, 131(2), 227-235.
17. Wang Y.H., Irving H.R. 2011. Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal. Behav.* 6, 494–500.