MECHANISM OF REGULATION OF *NICOTIANA BENTHAMIANA* DOMIN GERMINATION

REGULAČNÍ MECHANISMY KLÍČENÍ SEMEN *NICOTIANA BENTHAMIANA* DOMIN

Wünschová A., Beňová V., Vlašínová H., Havel L.

Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: andreaww@seznam.cz, lhavel@mendelu.cz

ABSTRACT

A target of our work was to find out how it is possible to enhance germination and break dormancy of seeds of *N. benthamiana*. Different compounds such as cyanide (KCN), pottassium ferricyanide (PFC), sodium nitroprusside (SNP), sodium nitrite and giberellins (GA) were used to fullfil our task. Abscisic acid (ABA) and paclobutrazol were also applied to know more about regulation of seed germination. Seeds of *N. benthamiana* were colected from plants planted in a greenhouse. These seeds were imbibed in 11–cm glass Petri dishes containing double layer of sterile filter paper (Whatman International Ltd, England) moistened with ten ml of sterile distilled water containing desired compounds. The imbibition lasted three days. Seeds of *N. benthamiana* were released from seed dormancy by after-ripening at room temperature and also at 4°C during cold treatment. After-ripening at room temperature was proved to be more efficient than cold treatment. KCN, PFC and SNP break seed dormancy of *N. benthamiana* in dose-dependent manner. The higher concentrations of these compounds (100 μM and 250 μM) were more sufficient in releasing dormancy. Also nitrite promotes germination of *N. benthamiana* seeds but in much higher concentrations (500 μM and 1000 μM). Exogenous application of GA_3 on dormant and non-dormant seeds had no effect on their germination. However, GA_{4+7} promoted germination of dormant seeds in dose-response manner and had no effect on germination of non-dormant seeds. GA_{4+7} also overcome the inhibition of germination by darkness. Paclobutrazol inhibited germination of non-dormant seeds of *N. benthamiana*. The response of non-dormant seeds was dose-dependent. The effect of ABA on half-dormant seeds was the same as on non-dormant seeds. ABA inhibited a protrusion of radicle but did not inhibite testa rupture. Whenever ABA was removed seeds started to germinate.

Key words: after-ripening, sodium nitroprusside, cyanide, giberellins, abscisic acid

ÚVOD

Porozumění klíčení semen, případně jejich dormanci, je velmi důležité nejen z hlediska našeho chápání přírodních procesů. Hlavní uplatnění nacházíme v zemědělství.

Dormance semen je definována jako vlastnost semene, která zabraňuje klíčení, i když podmínky pro klíčení jsou vhodné (Korneef at al. 2002). Tato vlastnost je rozšířená zvláště mezi druhy mírného pásu, pro které je výhodné odložit klíčení do doby než období a podmínky jsou vhodné pro růst klíčních rostlinek (Bewley 1997).

Při pokusech s kyselinou abscisovou (ABA) a mutanty majícími blokovanou syntézu ABA bylo zjištěno, že kyselina abscisová hraje zásadní úlohu při ustanovování a zachovávání dormance (Korneef et al. 2002, Leubner-Metzger et al. 2005).

Určité enviromentální faktory mohou vymanit semena z dormance. Pro toto vymanění z dormance je asi nejpoužívanějším prostředkem stratifikace (Valachovic 1991, Fang et al. 2006). U některých druhů lze pozorovat vymanění semen z dormance i během skladování, v procesu zvaném posklizňové dozrávání (Bewley 1997, Kucera et al. 2005, Probert 2000). Posklizňové dozrávání pravděpodobně reprezentuje přírodní mechanismus kontrolující klíčení v oblastech se suchým klimatem (Probert 2000).

Přítomnost světla je též důležitým faktorem pro klíčení semen. Některé druhy jsou fotodormantní a ve tmě neklíčí (Leubner-Metzger et al. 1995). Všeobecně je klíčení semen spojováno s poklesem hladiny ABA a naopak se zvýšením citlivosti ke giberelinům (GA) (Leubner-Metzger et al. 2005). Nejenže gibereliny mohou anulovat efekt ABA a indukovat klíčení (Leubner-Metzger et al. 2005), také mohou nahradit působení světla a indukovat klíčení fotodormantních semen ve tmě (Leubner-Metzger et al. 1995). Některé další hormony, jako etylén a brassinosteroidy, také pozitivně ovlivňují klíčení. Avšak tyto rostlinné hormony nedokáží zrušit fotodormanci (Leubner-Metzger 2001). Přestože gibereliny anulují efekt ABA, neindukují klíčení v přítomnosti inhibitorů ent-kaurene oxidázy (uniconazolu a paclobutrazolu) (Nambara et al. 1991,Li et al. 2005).

Je známo mnoho rozličných chemických sloučenin, které pozitivně ovlivňují klíčení. Tyto sloučeniny mohou být jak přírodní, tak syntetické. Přírodní sloučeninou je například kyanid, dusitan a dusičnan, k syntetickým sloučeninám patří například azid (Hilhorst and Karssen 1992, Debeaujon et al. 2000, Narimanov 2000).

Naše práce byla zaměřena na vliv fytohormonů (ABA, GA),dusíkatých a kyanid obsahujících sloučenin na klíčení semen *Nicotiana benthamiana* Domin. Také byl zahrnut vliv vybraných vlivů prostředí na dormanci semen tohoto druhu.

MATERIÁL A METODIKA

Semena *N. benthamiana* byla získána z rostlin pěstovaných ve skleníku v měsíci červnu a červenci. Rostliny nebyly přisvětlovány zářivkami a teplota kolísala v závislosti na počasí. Teplota často dosahovala třiceti i více stupňů Celsia. Semena byla sbírána poté, co se otevřela tobolka. Pak byla sušena po dobu 24 hodin při pokojové teplotě a skladována ve zkumavkách při –80°C. Při posklizňovém dozrávání byla semena uložena v papírových sáčcích při pokojové teplotě. Při ovlivňování chladem byla ve zkumavkách v chladničce při 4°C.

Pokusy klíčivosti

Semena *N. benthamiana* byla ovlivňována v 11-cm Petriho miskách, obsahujících dvojitou vrstvu sterilního filtračního papíru (Whatman International Ltd, Anglie). Filtrační papír byl zvlhčen 10 ml sterilní destilované vody, která obsahovala příslušnou sloučeninu. Ovlivňování trvalo 3 dny. Potom byla semena umyta a přenesena do nové Petriho misky. Výjimky jsou popsány v textu.

Semena klíčila při 23°C, fotoperiodě 16 hodin, v nepřetržitém toku chladného, bílého světla (Osram L 18/20). Pro inkubaci semen ve tmě byly Petriho miskyzabaleny do hliníkové fólie. Testy klíčivosti byly provedeny třikrát po třech Petriho miskách (každá miska obsahovala 50 semen). Semena byla prohlášena za vyklíčená když byla zpozorována radikula.

Chemikálie

Použité chemikálie byly v analytické čistotě. Nitroprussid sodný (SNP), kyanid draselný (KCN) a cis, trans – kyselina abscisová (ABA) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, Německo. Dusitan sodný vyrobila firma Lachema, Brno, Česká republika, GA3 (G 0907), GA4+7 (G 0938) a paclobutrazol (P 0922) od Duchefa Biochemie, Nizozemí, pottassium ferricyanide (PFC) od ICN Biomedicals Inc., USA.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vymanění semen z dormance v suchém stavu

V suchých semenech mohou probíhat procesy, které jsou schopny ukončit dormanci (Finch-Savage a Leubner-Metzger 2006). Takovým procesem je posklizňové dozrávání, které podle Proberta (2000) reprezentuje přírodní mechanismus kontrolující klíčení v oblastech se suchým klimatem. Zdá se, že semena N. *benthamiana* jsou toho příkladem, jelikož přestala být dormantní díky posklizňovému dozrávání, které proběhlo při pokojové teplotě (Obrázek 1A). K ukončení dormance došlo i při nižších teplotách (při ovlivnění chladem při 4°C) (Obrázek 1B). Porovnáním obou výsledků vyšlo najevo, že pokojová teplota je, v případě *N. benthamiana*, účinnější pro ukončení dormance semen než chlad (4°C). Rozdíl byl 4 týdny (Obrázek 1). Tento rozdíl lze asi vysvětlit klimatickými podmínkami v domovině *N. benthamiana*, jenž je původní v Austrálii. S největší pravděpodobností roste zejména na zastíněných místech jako jsou kaňony a ústí jeskyní (Horton 1981) proto, aby rostliny byly

chráněny před slunečními paprsky a suchem. Lze se tedy domnívat, že z ekologického hlediska je pro něj limitující ne nízká, ale vysoká teplota.

Sloučeniny zvyšující klíčivost

KCN, PFC a SNP zvyšuje klíčivost částečně dormantních semen *N. benthamiana* v závislosti na koncentraci jak je vidět na obrázku 2. Vyšší koncentrace těchto sloučenin byly účinnější (100 μM a 250 μM). Avšak použití 10 μM koncentrace příslušné látky mělo výhodu v tom, že se neprojevil toxický efekt těchto sloučenin. Tím pádem nebylo nutné semena umýt, aby začala klíčit. Toxický efekt výše zmíněných sloučenin v koncentraci 100 a 250 μM byl pozorován i u nedormantních semen. Nedormantní semena začala klíčit až po umytí (data nejsou uvedena).

Klíčení semen *N. benthamiana* podporoval i dusitan, ale v mnohem vyšších koncentracích (500 μM a 1000 μM) než předcházející sloučeniny (Obrázek 2). Bylo zjištěno, že i přes tyto vyšší koncentrace se semena nemusí umýt, a klíčí (data neuvedena). Dusičnan ve stejných koncentracích jako dusitan neměl vliv na klíčení semen (data neuvedena).

Naše výsledky podporují zjištění Bethkeho et al (2004). Jejich pokusy ukázaly, že KCN, PFC, SNP a dusitan ruší dormanci u *Arabidopsis*.

Vliv fytohormonů na klíčení semen

Gibereliny mají zásadní vliv na klíčení semen u *Arabidopsis* (Koornneef a van der Veen 1980). Avšak přestože je u rostlin známo více jak 100 různých GA, pouze několik z nich je biologicky aktivních. Mezi ně patří GA_3 a GA_4 (Crozier et al. 2000).

Aplikace GA_3 na dormantní i nedormantní semena *N. benthamiana* neovlivnila jejich klíčení (Obrázek 3A). Avšak ovlivnění semen GA_{4+7} přineslo velmi dobré výsledky. Částečně dormantní semena klíčila v závislosti na použité koncentraci a klíčení nedormantních semen nebylo ovlivněno (obrázek 3B). GA_{4+7} též ovlivňuje klíčení ve tmě. Semena *N. benthamiana* ve tmě neklíčila, pokud nebyl aplikován GA_{4+7} (data neuvedena). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky Li et al. (2005) a jejich pokusy s *Descurania sophia*. V těchto pokusech podporoval klíčení jen giberelin GA_4, ne GA_3.

Paclobutrazol je znám jako inhibitor syntézy GA, jenž inhibuje ent-kaurene oxidázu. Pokud je aplikován na semena *Arabidopsis*, tato semena neklíčí (Nambara et al. 1991).

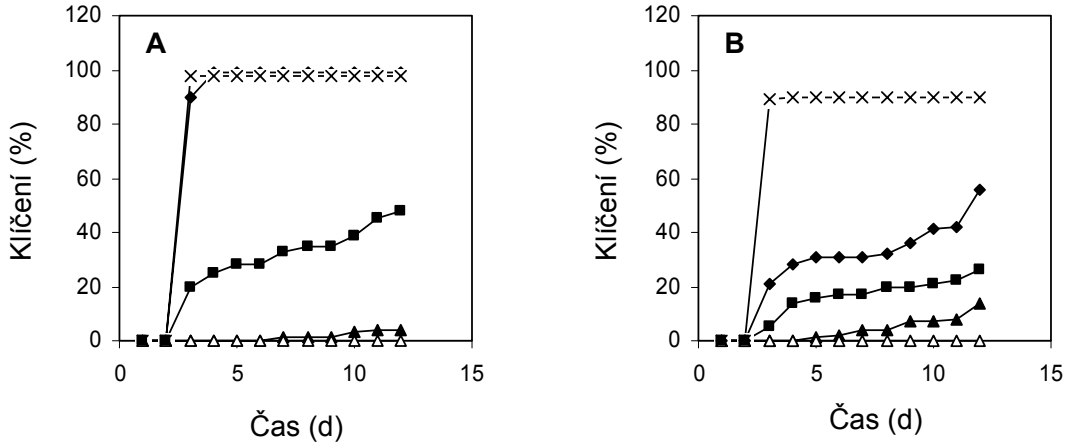
Obrázek 3C ukazuje jak paclobutrazol inhibuje klíčení nedormantních semen *N. benthamiana*. Vliv paclobutrazolu opět záležel na použitě koncentraci. Kdy 10 μM koncentrace neúčinně inhibovala klíčení, ale 100 μM koncentrace zredukovala klíčení na 27 % oproti kontrole (98 %). U 200 μM koncentrace nebylo pozorováno klíčení semen. Inhibující efekt paclobutrazolu bylo možné potlačit aplikací GA_{4+7} (ne GA_3) (data neuvedena).

ABA je důležitá z hlediska dormance semen, kdy zabraňuje klíčení. Avšak nezabraňuje prasknutí testy (pouze prasknutí endospermu) u *Nicotiana tabaccum* (Leubner-Metzger et al. 1995, 1998). Stejný efekt jako u *N. tabaccum* měla ABA i na *N. benthamiana*.

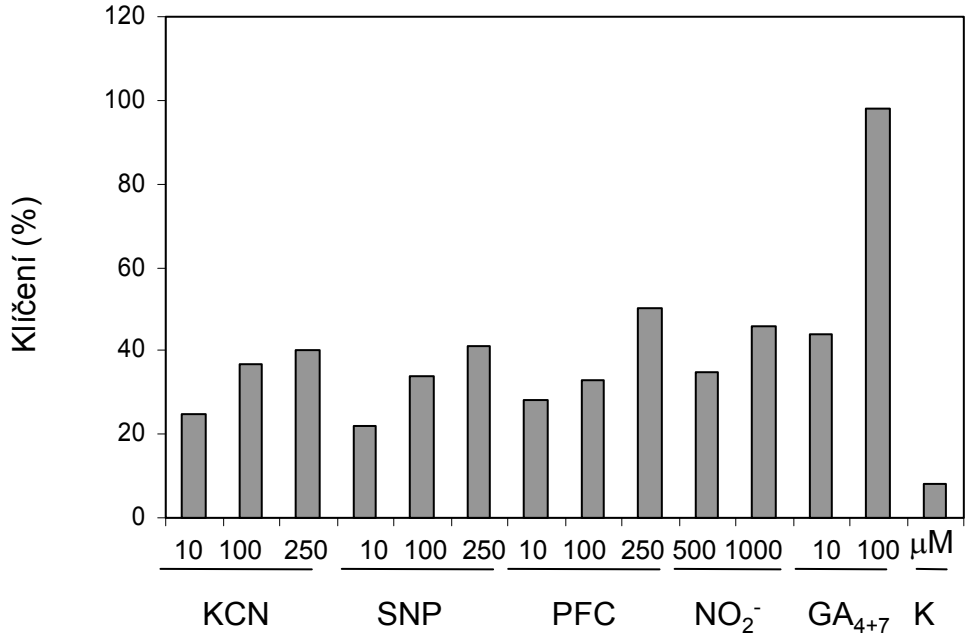
Kyselina abscisová měla stejný vliv jak na dormantní tak na nedormantní semena. ABA sice neinhibovala prasknutí testy, ale inhibovala radikulu, která nebyla pozorována. Takže semena nemohla být považována za vyklíčená (Obrázek 3D). Pokud byla semena umyta, a tak již nebyla inhibována ABA, začala klíčit (data neuvedena).

Vliv světla a tmy na klíčení semen

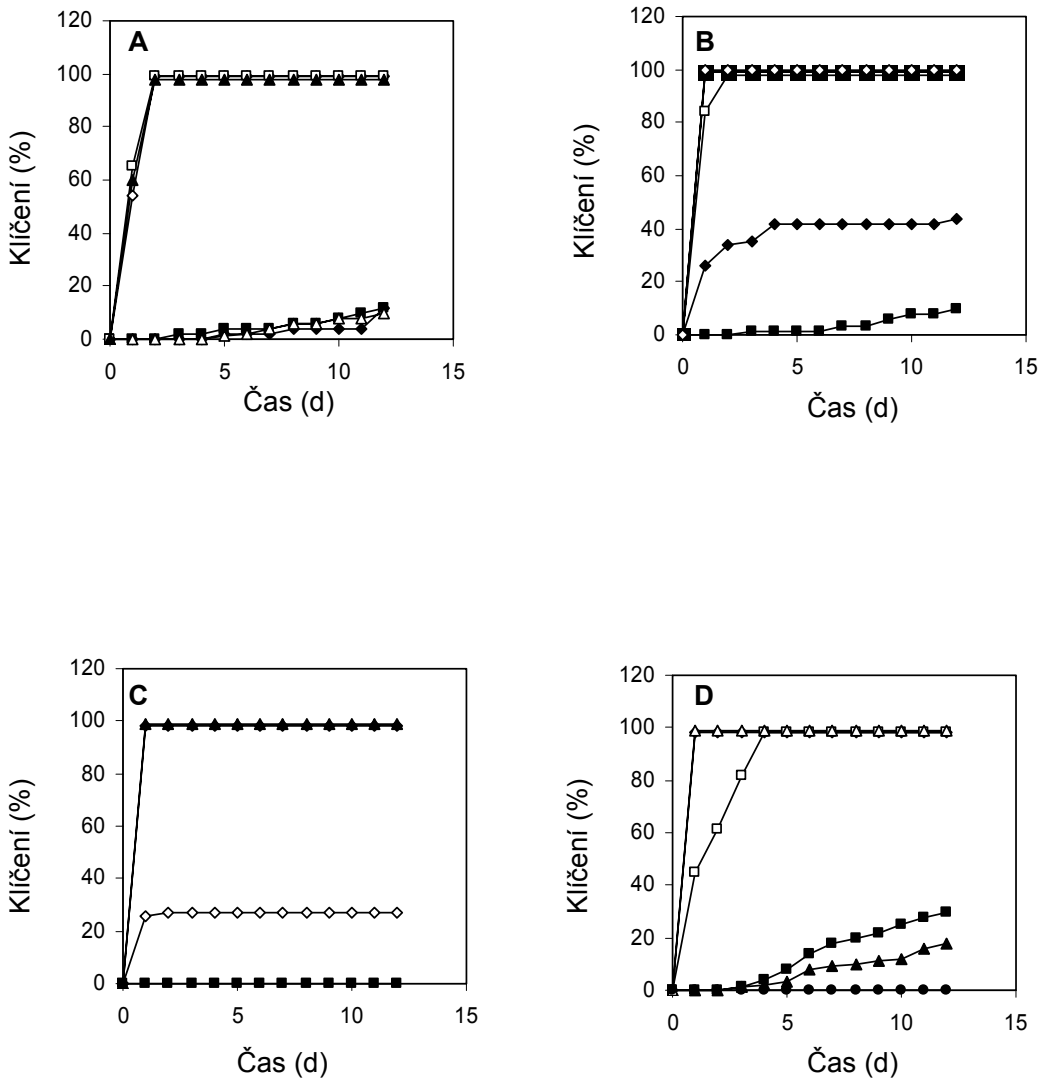
U nízkých koncentrací KCN, PFC, SNP a u všech koncentrací dusitanu byl pozorován rozdíl mezi tím, zda semena byla ovlivňována na světle nebo ve tmě. Obrázek 4A a 4B ukazuje, že klíčení semen bylo zpožděné v případě ovlivňování semen ve tmě. U vyšších koncentrací KCN, PFC a SNP (100 μM a 250 μM) nebyl tento jev pozorován, pravděpodobně díky již výše zmiňovanému toxickému efektu těchto sloučenin. Tato pozorování podporují tvrzení, že semena *N. benthamiana* jsou fotodormantní.



Obr. 1: posklizňové dozrávání, (A) pokojová teplota: △ihned po sklizni, ◢ po 2 týdnech, ■ po 4 týdnech, ◆ po 8 týdnech◆ × po 12 týdnech, (B) ovlivnění chladem: 4°C: △ ihned po sklizni, ◢ po 2 týdnech, ■ po 4 týdnech, ◆ po 8 týdnech, × po 12 týdnech.



Obr. 2: Sloučeniny rušící dormanci semen N. benthamiana

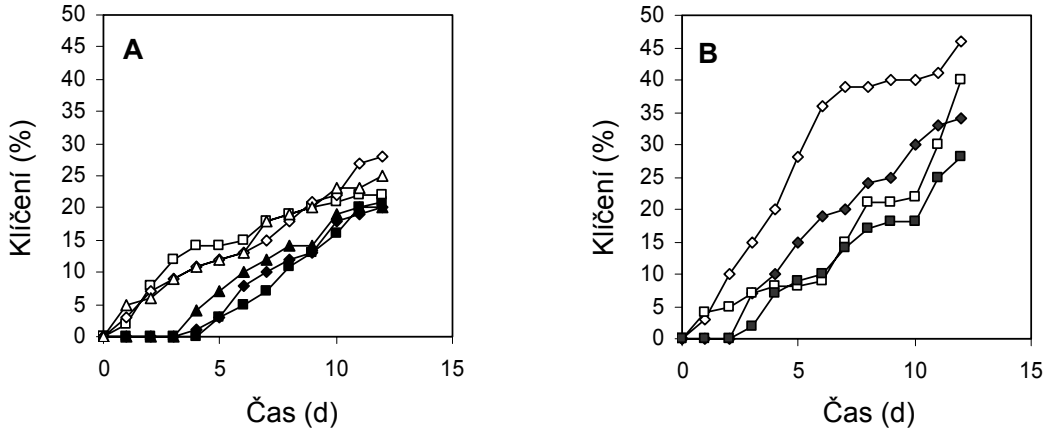


Obr. 3: Vliv giberelinů, paclobutrazolu a ABA na klíčení semen: (A) GA_3: △kontrola, ◆ dormantní semena ovlivněná 10 μM GA_3, ■ dormantní semena ovlivněná 100 μM GA_3, ◢ nedormantní semena: kontrola ◇ nedormantní semena ovlivněná 10 μM GA_3 □ nedormantní semena ovlivněná 100 μM GA_3

(B) GA_{4+7} ■ kontrola, ◆ dormantní semena ovlivněná 10 μM GA_{4+7} , □ dormantní semena ovlivněná 100 μM GA_{4+7} , ◢ nedormantní semena: kontrola, ◇ nedormantní semena ovlivněná 10 μM GA_{4+7}, △ nedormantní semena ovlivněná 100 μM GA_{4+7}

(C) paclobutrazol: ■ nedormantní semena ovlivněná 200 μM paclobutrazolem, ◇ nedormantní semena ovlivněná 100 μM paclobutrazolem, ◆ nedormantní semena ovlivněná 10 μM paclobutrazolem, ◢ nedormantní semena: kontrola,

(D) ABA a prasknutí testy (ne endospermu): ◆ dormantní semena ovlivněná 100 μM ABA, ◢ dormantní semena ovlivněná 10 μM ABA, ■ dormantní semena: kontrola, □ nedormantní semena ovlivněná 100 μM ABA, △ nedormantní semena: kontrola, ◇ nedormantní semena ovlivněná 10 μM ABA.



Obr. 4: Vliv světla a tmy na klíčení: (A): světlo: □ SNP 10 μM, △ KCN 10 μM ◇ PFC 10 μM, tma: ■ SNP 10 μM, ▲ KCN 10 μM ◆ PFC 10 μM, (B): světlo: ◇dusitan 1000 μM, □ dusitan 500 μM, tma: ◆ dusitan 1000 μM, ■ dusitan 500 μM.

ZÁVĚR

Zjistilo se, že posklizňové dozrávání při pokojové teplotě zruší dormanci semen *N. benthamiana* dříve, než ovlivnění chladem při 4°C. Dále bylo zjištěno, že KCN, PFC, SNP a dusitan sodný zvyšují klíčivost semen tohoto druhu. Ještě lepších výsledků klíčivosti lze dosáhnout při použití GA_{4+7}, zato GA_3 klíčení u *N. benthamiana* neovlivňuje. I u tohoto druhu se potvrdilo, že paclobutrazol inhibuje klíčení, které inhibuje i ABA. Též se nám podařilo potvrdit, že semena *N. benthamiana* jsou fotodormantní.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena grantem IGA: IG270111.

LITERATURA

Bethke P.C., Gubler F., Jacobsen J.V., Jones R.L. (2004): Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. Planta 219 (5): 847-855.

Bewley J.D. (1997): Seed germination and dormancy. Plant Cell 9: 1055-1066.

Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T. (2000): Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchana B. B., Gruissem W., Jones R. L. (eds), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, pp. 850-865.

Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koorneef M. (2000): Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiology 122, 403-413.

Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501-523

Horton P. (1981): A taxonomic revision of *Nicotiana* (Solanaceae) in Australia. J. Adelaide Bot. Gard. 3(1): 1-56.

Koornneef M. a van der Veen J.H. (1980): Induction and analysisof gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.)Heynh. Theor. Appl. Genet. 58: 257-263.

Korneef M., Bentsink L., Hilhorst H. (2002): Seed dormancy and germination. Current Opinion in Plant Biology.5: 33-36.

Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G. (2005): Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research 15: 281-307.

Leubner-Metzger G., Frundt C., Vogeli-Lange R., Meins F. (Jr.) (1995): Class I β-1,3 glucanases in the endosperm of tobacco during germination. Plant Physiology 109: 751-759.

Leubner-Metzger G., Petruzzelli L., Waldvogel R., Vogeli-Lange R., Meins F. (Jr.) (1998): Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional regulation of class I β-1,3 glucanase during tobacco seed germination. Plant Molecular Biology 38: 785-795.

Leubner-Metzger G. (2001): Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. Planta 213: 758-763.

Leubner-Metzger G. (2005): β-1,3 glucanase gene expresion in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. The Plant Jour. 41: 133-145.

Nambara E., Akazawa T., McCourt P. (1991): Effects of the gibberellin biosynthesis inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 97: 736-738.

Narimanov A.A. (2000): Presowing treatment of seeds with hydrogen peroxide promotes germination and development of plants. Biologia 55 (4): 425-428.

Probert R.J. (2000): The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In Fenner M. (ed.) Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities, 2nd edition. CAB International, 261-292.

Fang S.,Wang J., Wei Z., Zhu Z. (2006): Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja. Scientia Horticulturae 110 (3): 305-309.
Valachovic 1991

Li W., Liu X., Khan M. A., Kamiya Y., Yamaguchi S. (2005): Hormonal and environmental regulation of seed germination in flixweed (*Descurania sophia*). Plant Growth Regulation 45: 199-207.