https://doi.org/10.18778/8220-012-6.12

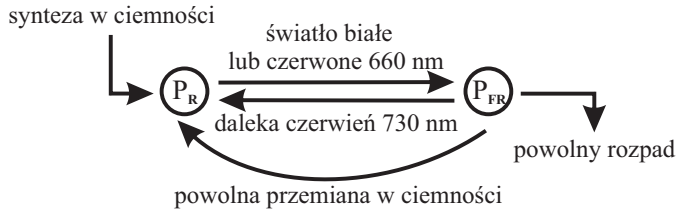
ROZDZIAŁ XII. **KIEŁKOWANIE NASION**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Kiełkowanie nasion, czyli zespół procesów zachodzących w nasieniu, które przygotowują zarodek do normalnej wegetacji, jest uwarunkowane czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi. Zdolne do kiełkowania są tylko nasiona, których zarodki są żywe i odpowiednio dojrzałe. Żywotność nasion określa się na podstawie barwienia zarodków chlorkiem trifenylotetrazoliowym lub indygokarminem. Procent nasion danego zbioru zdolnych do kiełkowania określany jest **zdolnością kiełkowania**. **Szybkość kiełkowania** (dawniej energia kiełkowania), czyli % nasion normalnie skiełkowanych w ciągu pewnego krótkiego okresu, określa stopień żywotności nasion. Na podstawie zdolności i szybkości kiełkowania ocenia się **jakość materiału siewnego**.

W procesie kiełkowania nasion wyróżnia się fazę fizyczną (pęcznienie nasion), biochemiczną i fizjologiczną. W fazie biochemicznej następuje aktywacja i synteza *de novo* enzymów uczestniczących w uruchamianiu materiałów zapasowych. W ziarniakach zbóż, których głównym materiałem zapasowym jest skrobia, w regulacji procesu uczestniczą hormony roślinne z grupy giberelin, wytwarzane przez rozwijający się zarodek.

Czynnikami środowiska zewnętrznego wpływającymi na kiełkowanie nasion są: woda, tlen, temperatura i światło. Nasiona wielu gatunków roślin (np. sałata, tytoń) wykazują stymulację kiełkowania pod wpływem światła. Najbardziej efektywne jest światło czerwone (660 nm). Efekt światła czerwonego jest odwracany przez daleką czerwień (730 nm). Receptorem światła w procesie kiełkowania nasion jest **fitochrom**, który w roślinach występuje w dwóch formach: $\mathbf{P_R}$ o maksimum absorpcji światła przy długości fali 660 nm i $\mathbf{P_{FR}}$ o maksimum absorpcji światła przy długości fali 730 nm. Obie formy fitochromu mogą podlegać **fotokonwersji**, czyli przekształceniom pod wpływem światła (por. rysunek 12.1).



Rysunek 12.1. Fotokonwersja fitochromu

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. *Ocena jakości siewnej nasion wybranych gatunków roślin użytkowych poprzez określenie ich żywotności oraz szybkości i zdolności kiełkowania.*
2. *Analiza uruchamiania związków zapasowych w katabolicznej fazie kiełkowania na przykładzie rozkładu skrobi w kiełkujących ziarniakach jęczmienia.*
3. *Wykazanie udziału fitochromu w procesie kiełkowania nasion.*

Doświadczenie I
Szybkość i zdolność kiełkowania

Zasada metody

Na podstawie kinetyki kiełkowania nasion określa się szybkość i zdolność kiełkowania.

Materiał

ziarniaki żyta, nasiona gorczycy i grochu

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego, bibuła, pęseta

Wykonanie doświadczenia

Szalki wyłożyć podwójną warstwą bibuły zwilżonej wodą tak, aby cienka warstwa wody była widoczna na powierzchni bibuły. Na szalkach umieścić po 25 ziarniaków/nasion wybranych gatunków roślin i wstawić je do termostatu na 25°C. Policzyć ziarniaki/nasiona, które wykiełkowały po 3 i 6 dniach.

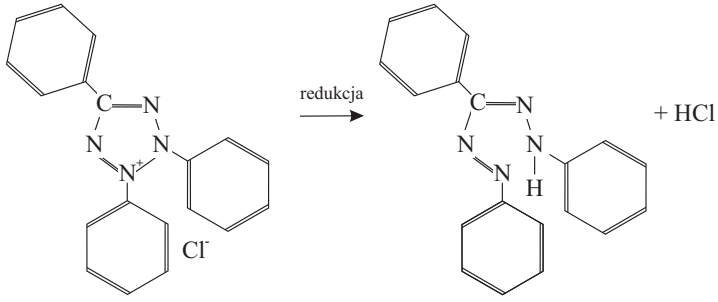
Opracowanie wyników

Ocenić szybkość i zdolność kiełkowania ziarniaków/nasion, podając wyniki w procentach skiełkowanych.

Doświadczenie II
Ocena żywotności nasion metodą barwienia zarodków

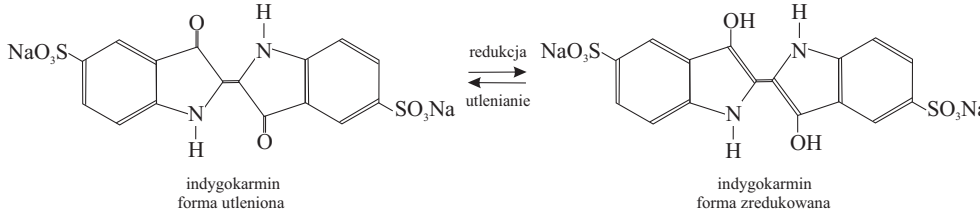
Zasada metody

Żywe, aktywne metabolicznie zarodki nasion redukują bezbarwny chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy (TTC) do trifenyloformazanu (TTC-H) i wybarwiają się na czerwono (por. rysunek 12.2).



Rysunek 12.2. Redukcja chlorku 2,3,5-trifenylotetrazoliowego (TTC)

Indygokarmin (forma utleniona) wybarwia martwe zarodki nasion na niebiesko. W formie zredukowanej jest bezbarwny (por. rysunek 12.3).



Rysunek 12.3. Reakcja redukcji i utleniania indygokarminu – wykorzystywana do oceny żywotności nasion

Redukcja barwników w żywych komórkach zachodzi dzięki aktywności dehydrogenaz uczestniczących w procesach oddechowych.

Materiał

nasiona grochu i ziarniaki kukurydzy w stanie pełnej imbibicji

Odczynniki

1% roztwór TTC, 0,2% roztwór indygokarminu

Sprzęt laboratoryjny

2 zlewki 200 cm^3, igła preparacyjna, skalpel, szalki Petriego, bagietka szklana

Wykonanie doświadczenia

Z 50 nasion fasoli wypreparować zarodki, opłukać je wodą destylowaną i umieścić w zlewce z roztworem TTC. Zlewkę pozostawić w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej na 1–2 godziny. Po tym czasie zarodki przemyć wodą i na podstawie wybarwienia ocenić ich żywotność.

Ziarniaki kukurydzy w stanie pełnej imbibicji (50 sztuk) przeciąć wzdłuż i jedną połowę każdego z nasion, po uprzednim opłukaniu wodą destylowaną, umieścić w zlewce z roztworem indygokarminu. Zlewkę pozostawić na 30 minut w temperaturze 30°C. Następnie ziarniaki opłukać wodą i ocenić ich żywotność na podstawie wybarwienia.

Opracowanie wyników

Obliczyć % nasion grochu i ziarniaków kukurydzy zdolnych do kiełkowania.

Doświadczenie III
Wykazanie obecności amylazy w kiełkujących nasionach

Zasada metody

W napęczniałych ziarniakach zbóż pod wpływem działania giberelin następuje indukcja amylaz, które na drodze enzymatycznej prowadzą rozkład skrobi przez stadium dekstryn do maltozy. W miarę hydrolizy skrobi następuje zmniejszanie się niebieskiego zabarwienia z jodem w reakcji z odczynnikiem Lugola (roztwór jodu w KI) i wzrost właściwości redukujących.

Materiał

skiełkowane nasiona pszenicy lub ziarniaki kukurydzy

Odczynniki

agar, 1% kleik skrobiowy, 10-krotnie rozcieńczony roztwór Lugola

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego o średnicy 5 cm, zlewka 100 cm^3, cylinder miarowy 25 cm^3, 3 pipety (0,1–5 cm^3), łaźnia wodna, skalpel, bagietka szklana

Wykonanie doświadczenia

W łaźni wodnej rozpuścić w zlewce 0,5 g agaru w 25 cm^3 wody destylowanej. Dodać 2,5 cm^3 1% kleiku skrobiowego i wylać po 5–7 cm^3 ciepłego agaru na szalki Petriego. Po zastygnięciu agaru powierzchnię szalek zwilżyć wodą destylowaną i wyłożyć po 5 nasion/ziarniaków przeciętych wzdłuż na pół, układając je powierzchnią cięcia na agarze. Po 2–3 godzinach inkubacji w termostacie w temperaturze 28°C nasiona/ziarniaki usunąć, a powierzchnię szalek zalać roztworem Lugola. Po kilku minutach zlać odczynnik.

Opracowanie wyników

Opisać uzyskany obraz i na tej podstawie wyciągnąć wnioski dotyczące uruchamiania substancji zapasowych w nasionach /ziarniakach.

Doświadczenie IV
Udział fitochromu w procesie kiełkowania nasion

Zasada metody

Monochromatyczne światło czerwone (660 nm) powoduje fotokonwersję $P_R \rightarrow P_{FR}$ w stopniu wystarczającym do stymulacji kiełkowania nasion wrażliwych na światło (dodatnio fotoblastycznych). Efekt jest odwracany przez naświetlenie światłem dalekiej czerwieni (730 nm).

Materiał

nasiona sałaty (odmiana Grand Rapids) moczone 24 godziny w temperaturze 28°C, na bibule zwilżonej wodą destylowaną, w 4 szalkach Petriego owiniętych szczelnie folią aluminiową (dla zachowania całkowitej ciemności); każda szalka zawiera 25 nasion

Sprzęt laboratoryjny

źródło monochromatycznego światła czerwonego (660 nm) i dalekiej czerwieni (730 nm)

Wykonanie doświadczenia

Wykonać następujące warianty naświetlania szalek z napęczniałymi nasionami sałaty:

- **a)** 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm),
- **b)** 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm) i następnie 4–8 minut oświetlenia światłem dalekiej czerwieni (730 nm),
- **c)** 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm), następnie 4–8 minut oświetlenia monochromatycznym światłem dalekiej czerwieni (730 nm) i 2–4 minuty oświetlenia światłem czerwonym (660 nm),
- **d)** brak oświetlenia (kontrola).

Naświetlanie przeprowadzić w ciemni. W czasie naświetlania szalki odwinąć z folii aluminiowej, odkryć i ustawiać skośnie w kierunku źródła światła o określonej długości fali na odpowiedni okres naświetlenia. Wszystkie szalki pozostawić w ciemności na 3 dni, a następnie policzyć nasiona, które wykiełkowały.

Opracowanie wyników

Na podstawie wyliczonego % nasion skiełkowanych w poszczególnych wariantach doświadczenia ocenić wpływ światła czerwonego i dalekiej czerwieni na kiełkowanie nasion sałaty i scharakteryzować rolę fitochromu w tym procesie.

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lack A. J., Evans D. E., *Krótkie wykłady. Biologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.