



Zjawisko topofizy w regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* u chryzantemy wielkokwiatowej

Małgorzata Zalewska, Natalia Miler

Pracownia Biotechnologii, Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych,
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. i J. Śniadeckich,
Bydgoszcz

Topophysis in adventitious shoots regeneration *in vitro* in chrysanthemum

Summary

Success of breeding programmes using adventitious shoots technique often depends on the regeneration efficiency. The aim of this study was to investigate the influence of topophysical position of explants on the efficiency of adventitious shoots regeneration.

Uniform, single shoots of chrysanthemum 'Satinbleu' propagated *in vitro* were divided equally into three topophysical zones: distal, central and proximal. Two leaves and two internodes were isolated from each zone. The explants were cultured for 12 weeks on MS medium supplemented with 0.6 mg l⁻¹ BAP and 2.0 mg l⁻¹ IAA.

Due to the highest adventitious shoots regeneration capability and the earliest formation of the shoots, the most suitable explants for breeding programmes for chrysanthemum are internodes excised from distal part of *in vitro* plantlet.

Key words:

topophysis, explants, adventitious regeneration, chrysanthemum.

Adres do korespondencji

Natalia Miler,
Katedra Roślin Ozdobnych
i Warzywnych,
Pracownia Biotechnologii,
Uniwersytet
Technologiczno-Przyrodniczy,
ul. Bernardyńska 6,
85-029 Bydgoszcz;
e-mail:
nmiler@utp.edu.pl

1. Wstęp

Zjawisko topofizy po raz pierwszy zdefiniował Molish w 1916 r. (1) jako zróżnicowany wzrost i rozwój sadzonek w zależności od ich lokalizacji na roślinie matecznej. Topofiza jest badana

przede wszystkim w aspekcie rozmnażania wegetatywnego roślin drzewiastych, u których stwierdzono silną zależność między położeniem pędu użytego jako sadzonka a zdolnością do jego ukorzenia się lub wzrostu generatywnego (2-4). Stwierdzono także wpływ lokalizacji topofizycznej sadzonki węzłowej na jej wzrost podczas rozmnażania chryzantem w warunkach *in vivo* (5). Eksplantat pierwotny, odpowiednik sadzonki, dający początek kulturze *in vitro*, przenosi pamięć o swoim statusie w roślinie matecznej („*inherent cellular state*”) do warunków kultury *in vitro* (6). Dowodem na to jest m.in. obserwowany wpływ położenia eksplantatu pierwotnego na roślinie donorowej na jego dalszy wzrost i regenerację w kulturach *in vitro*, co stwierdzono m.in. u daglezi (7), winorośli (8) oraz róży (9). Topofizyczna lokalizacja eksplantatu pierwotnego ma także znaczenie w regeneracji pędów przybyszowych *in vitro*, wpływa na ilość oraz na jakość pędów (10). Stwierdzono zależność liczby pędów przybyszowych wytworzonych *in vitro* od topofizycznej lokalizacji międzywęźli u chryzantemy *in vivo* (11), brakuje natomiast publikacji dokumentujących rolę zjawiska topofizy w izolowanym środowisku kultur *in vitro*.

Technika regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* ma duże znaczenie w mikro-rozmnażaniu oraz hodowli wielu roślin (12). U chryzantem technika pędów przybyszowych wykorzystywana jest wyłącznie w celach hodowlanych, a nie w laboratoryjnej produkcji sadzonek. Ponieważ pęd przybyszowy u chryzantemy powstaje z jednej komórki inicjalnej, cały zregenerowany pęd jest jednorodny genetycznie (13). Cecha ta sprawia, że metoda pędów przybyszowych jest stosowana w hodowli mutacyjnej (14), separacji komponentów chimer (15) oraz transformacji genetycznej (16). Wydajność organogenezy przybyszowej ma wówczas podstawowe znaczenie dla sukcesu hodowlanego, dlatego poszukuje się ciągle sposobów na zwiększenie efektywności namnażania pędów. Na regenerację pędów przybyszowych *in vitro* u chryzantemy mają wpływ: skład pożywki (17), rodzaj eksplantatu oraz genotyp (odmiana) (18), barwa światła stosowanego w pokoju wzrostowym (19), a nawet dawka promieniowania użytego do mutagenezy (20).

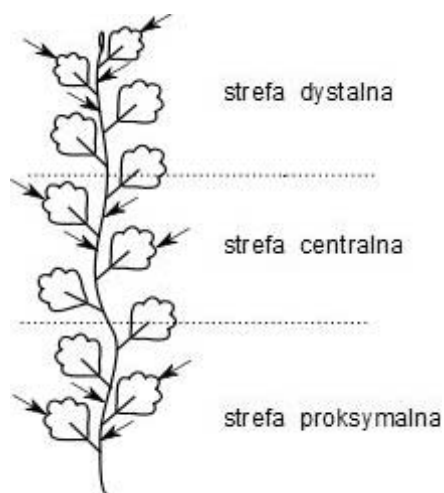
Celem doświadczenia było zbadanie wpływu topofizycznej lokalizacji eksplantatów liściowych i międzywęźli izolowanych z roślin rozmnażanych *in vitro* na regenerację pędów przybyszowych u chryzantemy.

2. Materiał i metody

W doświadczeniu użyto popularnej odmiany chryzantemy wielkokwiatowej (*Chrysanthemum x grandiflorum* /Ramat./ Kitam.) ‘Satinbleu’ otrzymanej w formie kultur pędowych z firmy VITROFLORA z Trzęsacza k. Bydgoszczy. Rośliny namnożono *in vitro* metodą jednowęzłowych fragmentów pędu na pożywce MS bez regulatorów wzrostu. Po namnożeniu wybrano jednakowe pędy mające po 12 węzłów, podzielono je na trzy równe części: proksymalną, centralną i dystalną. Z każdego fragmentu pędu pobierano poprzez odcięcie po dwa eksplantaty liściowe oraz po dwa międzywęźla (o długości

5 mm). Z części dystalnej pobrano eksplantaty położone najbliżej wierzchołka, z części centralnej – środkowe, natomiast z części proksymalnej pobrano eksplantaty najbliższe podstawie pędu (rys. 1). Eksplantaty liściowe oraz międzywęzła umieszczano na pożywce po pięć w jednym stoiku o pojemności 350 ml, zawierającym 40 ml pożywki. Międzywęzła wykładano na pożywkę horyzontalnie, natomiast liście wertykalnie, zagłębiając ogonek liściowy w pożywce. Zastosowano pożywkę MS o zwiększonej o połowę zawartości wapnia i żelaza, zestaloną agarą (0,8%), zawierającą sacharozę (3%), z dodatkiem benzyloaminopuryny (BAP) $0,6 \text{ mg dm}^{-3}$ oraz kwasu 3-indoliloctowego (IAA) $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Po dodaniu wszystkich składników, a przed autoklawowaniem pożywki, ustalono $\text{pH} = 5,8$. Kultury *in vitro* prowadzono w pokoju wzrostowym w temperaturze $24 \pm 2^\circ\text{C}$, przy szesnastogodzinnym fotoperiodzie, w warunkach światła dziennego emitowanego przez lampy fluorescencyjne Philips TLD 36W/54. Natężenie napromienienia kwantowego wynosiło $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Przez 12 tygodni prowadzono obserwacje dynamiki regeneracji pędów przybyszowych. Obliczano średnią liczbę pędów przybyszowych na jednym wyłożonym eksplantacie oraz procentowy udział eksplantatów regenerujących. Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym dla dwóch czynników: rodzaj eksplantatu (A) oraz pozycji topofizycznej eksplantatu (B), w czterech powtórzeniach, po 10 eksplantatów w powtórzeniu. Wyniki opracowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji oraz testem Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Obliczenia statystyczne prowadzono po dokonaniu transformacji rzeczywistych danych liczbowych. Dla średniej liczby pędów przybyszowych było to przekształcenie $y = \sqrt{x + 0,5}$, natomiast dane wyrażone w procentach transformowano zgodnie z przekształceniem kątowym Freemana-Tukeya. W tabelach z wynikami zaprezentowano rzeczywiste dane liczbowe, literami alfabetu wskazano grupy jednorodne po obliczeniach przeprowadzonych na danych transformowanych.



Rys. 1. Schemat podziału mikrosadzonki chryzantemy na strefy. Strzałki wskazują eksplantaty użyte w doświadczeniu.

3. Wyniki i dyskusja

Wpływ położenia eksplantatu na roślinie *in vivo* na regenerację pędów przybyszowych *in vitro* po raz pierwszy wykazała Tran Thanh van (10). Epiderma użyta jako eksplantat pierwotny u tytoniu, izolowana z łodygi z dolnej części rośliny matecznej, tworzyła wegetatywne pąki przybyszowe, natomiast pobrana z sąsiedztwa pąka wierzchołkowego tworzyła organy generatywne. Lu i in. (11) wykazali, że u chryzantem więcej pędów przybyszowych *in vitro* tworzy się z segmentów łodygi pobranych z górnej części pędu rosnącego w warunkach *in vivo*. W naszym doświadczeniu topofizyczna lokalizacja eksplantatu na pędzie wyrosłym w kulturach *in vitro* miała wpływ na zdolność do regeneracji pędów przybyszowych. Na międzywęźlach izolowanych ze strefy dystalnej i proksymalnej pędu tworzyło się siedmiokrotnie więcej pędów przybyszowych niż na eksplantatach ze strefy centralnej (tab. 1). Udział eksplantatów ze strefy centralnej podejmujących regenerację był niższy niż eksplantatów izolowanych ze strefy dystalnej i proksymalnej (tab. 2). U chryzantemy 'Royal Purple' najwięcej pędów przybyszowych wytworzyło się na segmentach łodygi pobranych z górnej części rośliny, najmniej zaś z eksplantatów najniżej położonych (11). Różnice te mogą wynikać z genotypów odmian i/lub odmiennych środowisk wzrostu roślin donorowych. Na eksplantatach liściowych z części proksymalnej w naszym doświadczeniu do regeneracji pędów wcale nie doszło. Najwięcej pędów przybyszowych na liściach wytworzyło się na eksplantatach izolowanych ze strefy dystalnej, przy czym była to liczba o połowę mniejsza niż w przypadku analogicznie usytuowanych międzywęźli. Specyficzny rozkład aktywności regeneracyjnej pędów przybyszowych na międzywęźlach oraz na liściach izolowanych z różnych poziomów na roślinie może wynikać m.in. z rozmieszczenia regulatorów wzrostu, przede wszystkim auksyn i cytokinin, w organach rośliny donorowej (21,22).

Tabela 1

Średnia liczba pędów przybyszowych wytworzonych na liściach i międzywęźlach izolowanych z różnych stref topofizycznych z mikrosadzonek chryzantemy wielokwiatowej 'Satinbleu'

Pozycja topofizyczna eksplantatu (B)	Eksplantat (A)		Średnia
	Międzywęźle	Liść	
dystalna	0,90 a ¹ A ²	0,43 a B	0,66 a
centralna	0,13 b A	0,05 b A	0,09 b
proksymalna	0,78 a A	0,00 b B	0,39 a
Średnia	0,60 A	0,16 B	–

¹ Dane w kolumnach oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie.

² Dane w wierszach oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie.

Tabela 2

Udział (%) eksplantatów regenerujących – liści i międzywęźli izolowanych z różnych stref topofizycznych z mikrosadzonek chryzantemy wielkokwiatowej ‘Satinbleu’

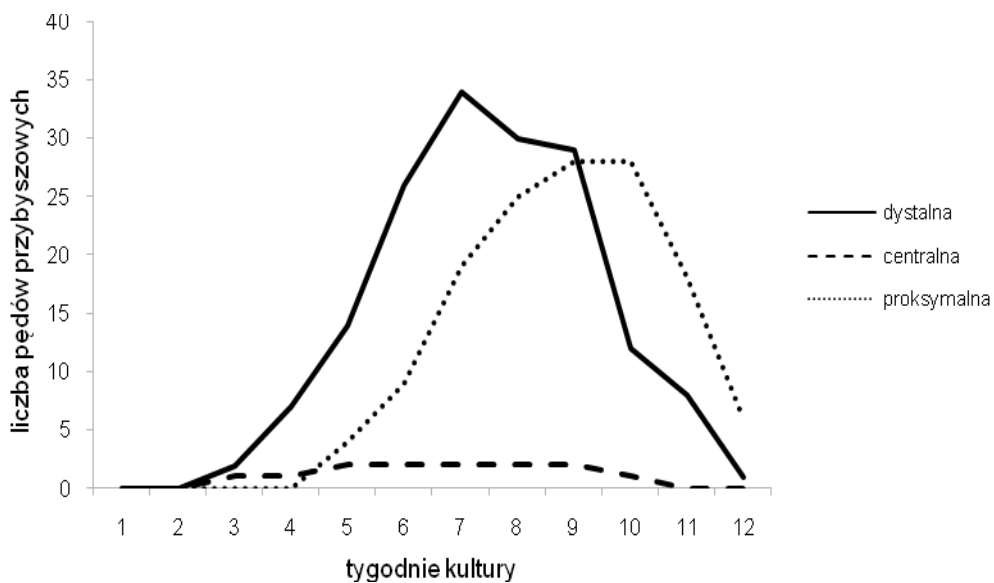
Pozycja topofizyczna eksplantatu (B)	Eksplantat (A)		Średnia
	Międzywęźle	Liść	
dystalna	27,5 a ¹ A ²	12,5 a B	20,5 a
centralna	10,0 b A	5,0 ab A	7,5 b
proksymalna	27,5 a A	0,0 b B	13,8 ab
Średnia	21,6 A	5,8 B	–

^{1, 2} Patrz tabela 1.

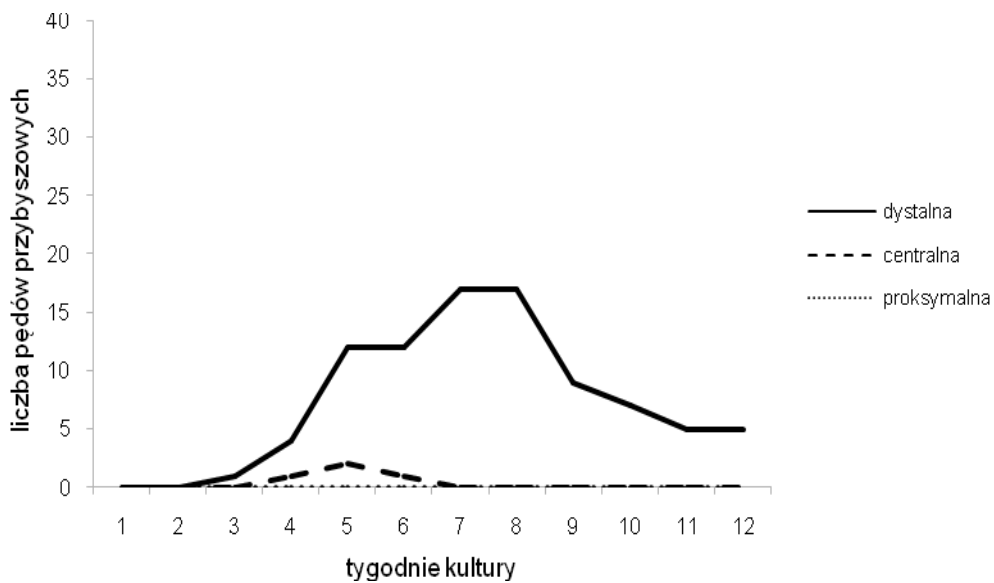
Eksplantaty liściowe wykazały mniejszą wydajność w tworzeniu pędów przybyszowych niż międzywęźla, mniejsza była także liczba liści podejmujących regenerację. Podobnie Himsted i in. (18) u dziewiętnastu badanych odmian chryzantem stwierdzili, wydajniejszą organogenezę w obrębie międzywęźli niż liści.

W doświadczeniu uzyskano stosunkowo niskie współczynniki namnażania, co można wytłumaczyć niską aktywnością regeneracyjną badanej odmiany (18). W eksperymencie Zalewskiej i in. (19) testowano odmiany pod kątem regeneracji pędów przybyszowych (na pożywce o takim samym składzie, jak w niniejszym doświadczeniu), uzyskując u odmiany ‘Lady Salmon’ średnią liczbę pędów przybyszowych na poziomie 1,6, natomiast u ‘Lady Amber’ 0,09, co wskazuje na zależność efektywności regeneracji od genotypu. Być może analizowana odmiana ‘Satinbleu’ nie odznacza się wysokim potencjałem regeneracyjnym.

Tworzenie pędów przybyszowych w doświadczeniu zachodziła w sposób pośredni. Międzywęźla w pierwszym tygodniu zwiększyły swoją objętość, a następnie zaczęły proliferować kalus w miejscu cięcia. Pierwsze pędy przybyszowe na eksplantatach izolowanych ze strefy dystalnej i centralnej pojawiły się w trzecim tygodniu kultury, natomiast na eksplantatach pobranych z części proksymalnej rozwój pierwszych pędów obserwowano dwa tygodnie później (rys. 2). Po zapoczątkowaniu regeneracji, w ciągu kolejnych 4 tygodni liczba pędów przybyszowych sukcesywnie zwiększała się, by osiągnąć maksimum w siódmym oraz w dziewiątym tygodniu (odpowiednio dla międzywęźli ze strefy dystalnej oraz proksymalnej). Potem obserwowano zamieranie pędów. Na eksplantatach izolowanych ze strefy dystalnej w dwunastym tygodniu kultury pozostał ostatecznie tylko jeden żywy pęd. Natomiast na eksplantatach izolowanych ze strefy proksymalnej, podczas ostatnich dwóch tygodni kultury obumarły dwadzieścia dwa pędy. Na eksplantatach liściowych pobranych z części dystalnej nowe pędy przybyszowe tworzyły się między trzecim a siódmym tygodniem kultury, potem obserwowano zamieranie pędów (rys. 3). Pędy rozwijały się w obrębie kalusa regenerującego wokół ogonka liściowego. Po siódmym tygodniu kultury obserwowano brązowienie kalusa oraz pożywki. Podobnie Himsted i in. (18)



Rys. 2. Dynamika regeneracji pędów przybyszowych na międzywęźlach izolowanych z różnych stref topofizycznych mikrosadzonek chryzantemy wielkokwiatowej 'Satinbleu'.



Rys. 3. Dynamika regeneracji pędów przybyszowych na eksplantatach liściowych izolowanych z różnych stref topofizycznych mikrosadzonek chryzantemy wielkokwiatowej 'Satinbleu'.

obserwowali największą dynamikę tworzenia się pędów przybyszowych u chryzantem między trzecim a siódmym tygodniem trwania kultury.

Na podstawie wyników doświadczeń sugeruje się, że wykorzystując technikę regeneracji pędów przybyszowych u chryzantemy, należy wziąć pod uwagę zależność aktywności regeneracyjnej eksplantatów od ich topofizycznej lokalizacji.

Literatura

1. Molish H., (1916), *Pflanzenphysiologie als Theorie der Gärtnerei*, Verlag von Gustav Fisher, Jena.
2. Marcelis-van Acker, C. A. M., (1994), *Ann. Bot.*, 74, 437-443.
3. Halim H., Edwards G. R., Coombe B. G., Aspinall D., (1988), *Ann. Bot.*, 61, 525-529.
4. Hansen, J., (1986), *Sci. Hort.*, 28, 177-186.
5. de Ruiter H. A., (1996), *Ann. Bot.*, 77, 99-104.
6. Tran Than van K. M., (1981), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 291-311.
7. Evers, P. W., (1987), in: Bonga J. M., Durzan D. J., Eds. (1987), *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 218-229.
8. Goldy S., Goldy R. G., (1991), *HortScience*, 26, 304-307.
9. Marcelis van-Acker C. A. M., Sholten H. J., (1995), *Sci. Hortic.*, 63, 47-55.
10. Tran Than van K. M., (1973), *Planta*, 115, 87-92.
11. Lu C.-Y., Nugent G., Wardley T., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 733-736.
12. van Aartrijk J., van der Linde P. C. G., van Telgen H. J., (1990), *Proceedings of Eucarpia Symposium "Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding"*, Wageningen.
13. Broertjes C., Keen A., (1979), *Euphytica*, 29, 73-89.
14. Miler N., (2005), *Biotechnologia*, 2, 196-205.
15. Zalewska M., Lema-Rumińska J., Miler N., (2007), *Sci. Hortic.*, 113, 70-73.
16. Teixeira da Silva J. A., (2003), *Biotech. Adv.*, 21, 715-766.
17. Annadana S., Rademaker W., Ramanna M., Udayakumar M., de Jong J., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 62, 47-55.
18. Himstedt J.P., Jacobsen H.J., Fischer-Klüver G., (2001), *Acta Hort.*, 560, 421-424.
19. Zalewska M., Miler N., Dąbrowska D., (2008), *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 525, 511-518.
20. Zalewska M., Lema-Rumińska J., (2004), *Biotechnologia*, 2, 86-92.
21. Everat-Bourbouloux A., Bonnemain J. L., (1980), *Physiol. Plant.*, 50, 145-152.
22. Zieslin N., Algom R., (2004), *Sci. Hortic.*, 102, 301-309.