



Wpływ cytokinin na odpowiedź morfogenetyczną eksplantatów pochodzących z siewek *Polemonium coeruleum*

Alina Trejgell, Andrzej Tretyn

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

The effect of cytokinins on morphogenetic response of *Polemonium coeruleum* seedlings explants

Summary

The aim of the presented research was to examine the morphogenetic response of *Polemonium coeruleum* explants. The donor material were 10-day-old seedlings. Surface sterilized seeds were germinated on MS medium supplemented with GA₃ (1 mg·dm⁻³). Seedling explants (shoot tips, fragments of cotyledons, hypocotyls and roots) were isolated and transferred onto solidified MS medium supplemented with different types of cytokinins (BA, KN, ZEA, 2iP) at concentrations 1.0, 3.0 and 5.0 mg·dm⁻³ in combination with NAA (0.1 mg·dm⁻³).

All explant types were characterized by callus proliferation. It was observed that calli developed on the entire surface of hypocotyl and root fragments. On the other hand, shoot tips and cotyledonary petioles formed callus tissue at the cut ends, and petioles only at abaxial ends. The growth of calli on all explant types was strongly stimulated by ZEA. Among the explants tested, only shoot tips exhibited shoot organogenesis. The highest frequency of shoot organogenesis was observed when the explants were cultured on a medium supplemented with 5.0 mg·dm⁻³ BA (100%) or 5.0 mg·dm⁻³ ZEA (97%). The highest shoot number per explant was obtained in the presence of 5.0 mg·dm⁻³ ZEA (8.4 on average). The presence of BA or ZEA in the proliferation medium inhibited rhizogenesis and the elongation growth of shoots. However, root organogenesis was supported by KN added into the medium.

Adres do korespondencji

Alina Trejgell,
Zakład Biotechnologii,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet
Mikołaja Kopernika,
ul Gagarina 9,
87-100 Toruń;
e-mail:
trejgell@biol.uni.torun.pl

biotechnologia

2 (89) 125–131 2010

Key words:

Polemonium coeruleum, callus, shoot tip, organogenesis.

1. Wstęp

Wielosił błękitny (*Polemonium coeruleum* L.), należący do rodziny wielosiłowatych (*Polemoniaceae*) jest reliktem glacialnym, z głównym ośrodkiem występowania w środkowo-wschodniej i północnej Europie. W Polsce występuje na rozproszonych stanowiskach, głównie na niżu. Najliczniejsze stanowiska znajdują się na Pojezierzu Kaszubskim i Mazurskim. Gatunek wymaga wilgotnych siedlisk jak: podmokłe łąki, torfowiska niskie, czy brzegi potoków. *P. coeruleum* jest hemikryptofitem, posiadającym mięsiste, silnie ukorzenione kłącze oraz wzniesioną łodygę, osiagającą wysokość 20-120 cm, na szczycie której występują kwiaty o barwie fioletowej lub niebieskiej, zebrane w wiechy (1,2). Kłącza i korzenie zawierają liczne związki o właściwościach leczniczych, np. trójterpenowe saponiny, flawonoidy, kumarynę, czy kwasy organiczne. Preparaty z wielosiłu wykorzystywane są w leczeniu chorób wrzodowych żołądka i dwunastnicy, astmy, anemii, nerwic oraz padaczki. Ponadto przyspieszają krzepnięcie krwi, obniżają jej ciśnienie i poziom cholesterolu (3,4).

Roślina została uznana za gatunek narażony na wyginięcie i objęta ochroną gatunkową (kategoria zagrożenia VU). Przyczyn tendencji regresywnych *P. coeruleum* możemy doszukiwać się w naturalnych zjawiskach sukcesji ekologicznej jak i presji człowieka. Głównymi przyczynami zanikania stanowisk są zmiany stosunków wodnych (przesuszenie wilgotnych łąk i zabiegi melioracyjne) oraz warunków świetlnych (zaniechanie użytkowania, zarastanie łąk) (5). Bierne formy ochrony środowiska, jak się wydaje, są niewystarczające dla zachowania tego gatunku. Dlatego analiza potencjału regeneracyjnego *P. coeruleum* i opracowanie wydajnego systemu regeneracyjnego dla tego gatunku może być w przyszłości skutecznym narzędziem aktywnej ochrony gatunkowej. Podjęte badania stanowią pierwszą próbę regeneracji *P. coeruleum* w warunkach *in vitro*.

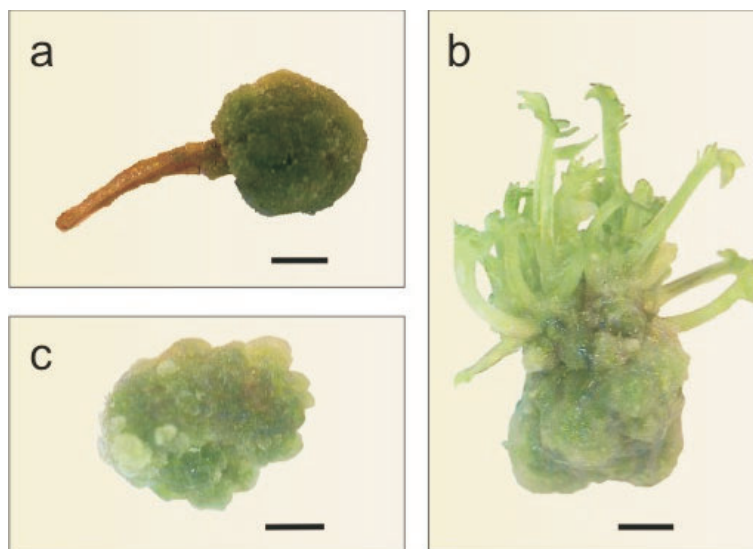
2. Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do badań były 10-dniowe siewki *Polemonium coeruleum* L. Nasiona skaryfikowano stężonym H_2SO_4 przez 10 min, a następnie odkażano kolejno w: 70% (v/v) EtOH przez 30 s i 20% (v/v) NaOCl (Domestos) przez 20 min, po czym płukano sterylną wodą destylowaną. Wysterylizowane powierzchniowo nasiona kiełkowano na zmodyfikowanej pożywce MS (6) z dodatkiem kwasu giberelinowego (GA_3) w stężeniu $1\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ i zestalonej 0,7% (w/v) agarem. Eksplantaty siewek: wierzchołki wzrostu z węzłem liścieniowym, fragmenty liścieni (ogonki i blaszka o długości 3-4 mm), bazalne części hypokotyli (1-2 mm) oraz fragmenty korzeni (3-4 mm) izolowano i wykładano na pożywki MS uzupełnione 3% (w/v) sacharozą, 0,7% (w/v) agarem i różnymi cytokininami: 6-benzylaminopuryną (BA), zeatyną (ZEA), kinetyną (KN) lub 2-izopentyloadeniną (2iP) w stężeniach: 1, 3 i $5\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ w kombinacji z kwasem naftalenoctowym (NAA) w stężeniu $0,1\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$; pH po-

żywki doprowadzono do 5,8 przed autoklawowaniem. Hodowlę prowadzono w temperaturze $26 \pm 1^\circ\text{C}$ na ciągłym świetle o natężeniu $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Eksplantaty pasażowano na świeże pożywki po 4 tygodniach hodowli. Oceny zdolności morfogenetycznej eksplantatów dokonano po 2, 4 i 8 tygodniach. Analizowano następujące parametry: procent eksplantatów zdolnych do kalusowania i organogenezy pędów/korzeni, świeżą masę kalusa, liczbę pędów/korzeni na eksplantat oraz długość pędów, rozwijających się na eksplantacie. W każdym wariancie doświadczenia analizie poddano 20 eksplantatów, doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki zanalizowano przy użyciu metody ANOVA, z zastosowaniem testu Tukeya, wartości F podano w tabelach dla $p < 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

Indukcja kalusa była obserwowana już po 2 tygodniach hodowli na wszystkich typach eksplantatów. Był on intensywnie zielony i miał zwartą, grudkowatą strukturę. Fragmenty liścieni były zdolne do kalusowania jedynie na ogonkach na końcach bazalnych (fot. 1a), natomiast blaszki liścieniowe nie wykazywały zdolności do kalusowania i w ciągu 4 tygodni obumierały. Rozwój kalusa na ogonkach liściowych *Actinidia* także był obserwowany jedynie na końcach bazalnych (7), a w badaniach nad rege-



Fot. 1. Kalus rozwijający się na eksplantatach pochodzących z 10-dniowych siewek *Polemonium coeruleum* na pożywce MS uzupełnionej ZEA w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ w kombinacji z NAA w stężeniu $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ po 8 tygodniach hodowli: ogonka liścienia (a), wierzchołka wzrostu pędu (b) i fragmentu hypocotyłu (c) (odcinek = 2 mm).

neracją *Lycopersicon esculentum* stwierdzono silniejszy rozwój kalusa i indukcję pędów po tej stronie liścieni (8). Na wierzchołkach pędów u ich podstawy obserwowano zarówno rozwój pędów, jak i kalusa (fot. 1b), natomiast na fragmentach hypokotyli i korzeni kalus rozwijał się na całej powierzchni eksplantatów (fot. 1c). Najintensywniejszy wzrost kalusa był obserwowany na pożywce wzbogaconej w zeatynę (w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) niezależnie od rodzaju eksplantatu (tab. 1). Masa kalusa indukowanego na pożywkach uzupełnionych KN, a szczególnie 2iP była znacznie mniejsza. Ogonki liścieniowe hodowane na pożywce z 2iP nie wykazywały zdolności do proliferacji komórek na żadnym z zastosowanych stężeń tego hormonu (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ typu i stężenia cytokininy w kombinacji z NAA [$0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$] na indukcję i wzrost kalusa na eksplantatach *Polemonium coeruleum* po 8 tygodniach kultury

Typ cytokininy	Stężenie [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Wierzchołek wzrostu		Ogonek		Hypokotyl		Korzeń	
		[%]	świeża masa [mg]*	[%]	świeża masa [mg]*	[%]	świeża masa [mg]*	[%]	świeża masa [mg]*
BA	1	100	262,1±44,9 bc	100	16,5±2,9 b	100	88,8±15,3 bc	100	32,6±4,3 d
	3	100	199,3±45,6 bc	38,3	10,6±2,2 b	100	97,4±13,4 bc	100	25,5±1,3 d
	5	100	361,5±75,1 ab	0	–	100	65,7±6,1 c	100	126,5±28,8 bc
KN	1	100	77,1±13,4 c	0	–	100	45,1±14,8 c	100	14,8±2,1 d
	3	100	114,0±15,2 c	75,0	27,2±7,3 b	100	56,3±8,6 c	100	55,2±10,5 d
	5	100	259,6±37,6 bc	47,5	18,1±3,0 b	100	23,7±1,8 c	100	70,4±4,5 cd
Zea	1	100	185,9±31,4 bc	100	16,6±2,4 b	100	162,2±15,4 b	100	137,8±8,5 b
	3	100	336,0±21,1 ab	100	72,5±9,6 a	100	226,5±18,4 b	100	137,5±8,3 b
	5	100	512,5±78,7 a	100	80,6±11,7 a	100	441,7±44,9 a	100	313,8±38,0 a
2iP	1	100	246,7±21,1 bc	0	–	100	45,0±3,9 c	100	32,4±3,9 d
	3	100	166,2±17,2 bc	0	–	100	48,8±6,7 c	100	38,5±5,4 d
	5	100	231,3±52,9 bc	0	–	100	29,2±2,3 c	100	39,1±5,5 d
F			7,30		21,18		45,98		39,03

*Średnie wraz z błędem standardowym oznaczone tymi samymi literami w obrębie kolumny nie różnią się istotnie przy $p < 0,05$.

Organogenezę pędów stwierdzono jedynie na wierzchołkach wzrostu pędów, przy czym proces ten był dostrzegalny już w trzecim tygodniu hodowli. Na eksplantatach obserwowano rozwój pąków pachwinowych (fot. 1b), a w obrębie kalusa różnicowanie nielicznych pąków przybyszowych. Wierzchołki wzrostu stanowią bardzo wydajny materiał donorowy do namnażania pędów u wielu gatunków roślin (9-12). Najwyższą frekwencję organogenezy pędów na wierzchołków wzrostu *P. coeruleum* obserwowano na pożywce uzupełnionej BA w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (100%) i ZEA

w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (97%). Wskaźnik namnażania wyniósł średnio $7,7\pm 0,6$ na pożywce z dodatkiem BA i $8,6\pm 0,7$ w obecności ZEA (tab. 2). Natomiast na wierzchołkach wzrostu traktowanych KN i 2iP uzyskano zarówno znacznie niższy odsetek eksplantatów zdolnych do organogenezy pędów, jak i liczbę pędów na eksplantat, niezależnie od zastosowanego stężenia hormonu (tab. 2). Z danych literaturowych wynika, że BA jest bardziej efektywną cytokininą podczas proliferacji pędów niż pozostałe cytokiny (10) i jest powszechnie stosowana do indukcji tego procesu (13,14). Jednak dla niektórych gatunków większą lub porównywalną wydajność regeneracji uzyskiwano stosując w pożywce regeneracyjnej zeatynę (15), kinetynę (9,16,17), czy 2iP (18). Wzrost elongacyjny rozwijających się pędów na pożywkach regeneracyjnych był wyraźnie hamowany w obecności BA i ZEA (fot. 2a) w porównaniu do pędów rozwijających się na pożywkach z 2iP i KN (fot. 2b), niezależnie od zastosowanego stężenia cytokinin. Hamowanie wzrostu elongacyjnego pędów na pożywkach uzupełnionych BA było obserwowane także podczas regeneracji *Saussurea obvallata* (19), czy *Eclipta alba* (20).

Tabela 2

Wpływ typu i stężenia cytokinin w kombinacji z NAA [$0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$] na zdolności regeneracyjne wierzchołków wzrostu pędu *Polemonium coeruleum* po 8 tygodniach kultury

Typ cytokinin	Stężenie [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]	[%] organogenezy korzeni	Liczba korzeni/eksplant*	[%] organogenezy pędów	Liczba pędów/eksplant*	Długość pędów* [mm]
BA	1	3,3	$1,0\pm 0,0$ b	88,9	$4,9\pm 0,5$ bc	$35,8\pm 1,8$ bc
	3	0	–	85,3	$4,9\pm 0,8$ bc	$26,1\pm 2,3$ cd
	5	0	–	100	$7,7\pm 0,6$ ab	$19,2\pm 2,5$ d
KN	1	100	$4,6\pm 0,5$ a	31,1	$1,7\pm 0,2$ d	$62,8\pm 4,6$ a
	3	78,3	$2,8\pm 0,3$ ab	59,5	$2,4\pm 0,3$ d	$47,9\pm 2,9$ b
	5	37,8	$1,7\pm 0,2$ b	54,6	$1,9\pm 0,3$ d	$36,4\pm 3,7$ bc
Zea	1	0	–	78,5	$4,2\pm 0,5$ bc	$37,3\pm 2,8$ bc
	3	0	–	95,4	$5,5\pm 0,5$ ab	$22,6\pm 1,9$ d
	5	0	–	97,0	$8,6\pm 0,7$ a	$18,0\pm 1,7$ d
2iP	1	68,3	$1,3\pm 0,1$ b	37,2	$1,4\pm 0,1$ d	$43,3\pm 6,9$ b
	3	52,2	$1,8\pm 0,2$ b	73,7	$2,0\pm 0,3$ d	$48,5\pm 2,9$ ab
	5	25,9	$1,2\pm 0,1$ b	54,8	$2,9\pm 0,6$ cd	$35,8\pm 3,0$ bc
F			32,31		17,17	21,31

* Średnie wraz z błędem standardowym oznaczone tymi samymi literami w obrębie kolumny nie różnią się istotnie przy $p < 0,05$.



Fot. 2. Mikropropagacja pędów na wierzchołkach wzrostu *Polemonium coeruleum* po 8 tygodniach hodowli na pożywce MS uzupełnionej ZEA w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (a) lub KN w stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (b) w kombinacji z NAA w stężeniu $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ (odcinek = 1 cm).

Obecność BA i ZEA w pożywce proliferacyjnej hamowało także ryzogenezę. Hamujący wpływ cytokinin, a szczególnie BA na indukcję korzeni stwierdzono we wcześniejszych badaniach nad regeneracją roślin np. z rodziny *Poaceae* (21), *Asteraceae* (12,22) czy *Hypericaceae* (23). Indukcja korzeni była obserwowana jedynie na pożywkach uzupełnionych KN i 2iP. Korzenie różnicowały się zarówno w obrębie kalusa, jak i bezpośrednio na rozwijających się pędach (fot. 2b). Najbardziej efektywnie proces ten przebiegał na pożywce uzupełnionej kinetyną w stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, gdzie na wszystkich eksplantatach obserwowano indukcję korzeni, a średnia liczba korzeni na eksplantat wynosiła $4,6 \pm 0,5$ (tab. 2). Wzrost stężenia kinetyny w pożywce wyraźnie hamował ten proces.

Zróżnicowana odpowiedź eksplantatów na różne typy cytokinin może wynikać z odmiennej struktury tych związków i w konsekwencji różnic w ich pobieraniu oraz mechanizmie działania (23). Ponadto zróżnicowana wrażliwość tkanek na regulatory wzrostu oraz różny poziom endogennych cytokinin w poszczególnych częściach siewek może być przyczyną różnic w ich zdolnościach do organogenezy pędów (24,25).

Pędy uzyskane na pożywkach wzbogaconych w BA i ZEA ukorzeniano na podłożu pozbawionym regulatorów wzrostu. Regeneraty łatwo aklimatyzowały się do warunków *ex vitro* i podejmowały wzrost w warunkach uprawy szklarniowej.

4. Podsumowanie

Najintensywniejszy przyrost masy kalusa był obserwowany na pożywkach wzbogaconych w zeatynę. Spośród analizowanych typów eksplantatów *P. coeruleum* jedynie wierzchołki wzrostu pędów stanowiły materiał zdolny do regeneracji pędów. Najlepszymi do namnażania pędów *P. coeruleum* były pożywki uzupełnione o BA lub ZEA w stężeniu $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kombinacji z NAA w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, jednak ukorzenienie pędów wymagało pasażu na pożywkę pozbawioną regulatorów wzrostu.

Literatura

1. Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z., (2003), *Atlas roślin chronionych*, Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa.
2. Gibbons B., Brough P., (1995), *Atlas roślin Europy Północnej i Środkowej*, Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa.
3. Jędrzejko K., Klama H., Żarnowiec J., (1997), *Zarys wiedzy o roślinach leczniczych*, Śląska Akademia Medyczna, Katowice.
4. Golyak Y. A., Khishova O. M., Dubashinskaya N. V., Kukhareva L. V., (2008), *Pharmac. Chem. J.*, 42, 456-459.
5. Zarzycki K., Kaźmierczakowa R., (2001), *Polska Czerwona Księga Roślin*, Kraków, IB PAN, 310-311.
6. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 437-497.
7. Centeno M. L., Rodriguez A., Albuerno M. A., Feito I., Fernandez B., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 480-486.
8. Bhatia P., Ashwath N., Midmore D. J., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 457-464.
9. Faisal M., Siddique I., Anis M., (2006), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 59-64.
10. Sujatha G., Ranjitha Kumari B. D., (2007), *Acta Physiol. Plant.*, 29, 189-195.
11. Ma X.-H., Wu T.-L., (2008), *Acta Physiol. Plant.*, 30, 209-216.
12. Trejgell A., Dąbrowska G., Tretyn A., (2009), *Acta Physiol. Plant.*, 31, 445-453.
13. Wójcik A., Podstolski A., (2007), *Acta Physiol. Plant.*, 29, 151-156.
14. Ray A., Bhattacharya S., (2008), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92, 315-319.
15. Cui M.-L., Takayanagi K., Handa T., (2004), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 78, 51-53.
16. Sairam Reddy P., Rodrigues R., Rajasekharan R., (2001), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 66, 183-188.
17. Makunga N. P., Jäger A. K., van Staden J., (2005), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 82, 271-280.
18. Taha H. S., Bekheet S. A., Saker M. M., (2001), *Biol. Plant.*, 44, 431-433.
19. Joshi M., Dhar U., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 933-939.
20. Baskaran P., Jayabalan N., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 532-539.
21. Poonawala I. S., Jana M. M., Nadgauda R. S., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 696-700.
22. Sujatha M., (1997), *Euphytica*, 93, 89-95.
23. Kim K. H., Park H. K., Park M. S., Yea U. D., (2001), *J. Plant Biotech.*, 3, 95-100.
24. Yucesan B., Turke A. U., Gurel E., (2007), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 91, 243-250.
25. Lisowska K., Wysokinska H., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 60, 171-176.