



Mikrorozmnażanie *Leucojum aestivum* L. w bioreaktorze RITA[®]

Agata Ptak, Joanna Gądek

Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

Micropropagation of *Leucojum aestivum* L. in bioreactor RITA[®]

Summary

Embryogenic callus of *Leucojum aestivum* was transferred to solid and liquid media in bioreactor RITA[®] vessels. Callus growth on the liquid medium enriched with 2 and 5 μM Picloram and 0.5 μM BA was characterized by a higher multiplication index. The greatest number of somatic embryos was observed on the callus multiplied in bioreactor using 5-minute flushing with the medium. Globular embryos developed into torpedo-stage embryos and plantlets under the influence of NAA (0.5 μM) and zeatin (5 μM). Liquid medium promoted the development of *L. aestivum* somatic embryos and plantlets.

Key words:

Amaryllidaceae, embryogenic callus, somatic embryos, bioreactor RITA[®].

1. Wstęp

Śnieżycza letnia (*Leucojum aestivum* L.) jest przedstawicielem rodziny amarylkowatych (*Amaryllidaceae*) (1). Jest ozdobną rośliną cebulową, ma także właściwości lecznicze. Roślina ta jest cennym źródłem wielu alkaloidów izochinolinowych, m. in. galantaminy, nor-galantaminy i likoryny. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje galantamina, która jest odwracalnym inhibitorem acetylocholinesterazy i aktualnie znajduje zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera (2).

W dotychczasowych badaniach wykazano, że kalus embriogeniczny oraz zarodki somatyczne śnieżycy letniej mogą być cennym źródłem galantaminy i innych alkaloidów *Amaryllidaceae*. Jednak ilości alkaloidów uzyskiwane tą drogą nie są jeszcze

Adres do korespondencji

Agata Ptak,
Katedra Hodowli Roślin
i Nasiennictwa,
Uniwersytet Rolniczy,
ul. Łobzowska 24,
31-140 Kraków;
e-mail:
mfptak@cyf-kr.edu.pl

wystarczająco duże (3). Wprowadzenie pożywek płynnych oraz bioreaktorów mogłoby znacznie zwiększyć wydajność somatycznej embriogenezy, a także produkcję alkaloidów z udziałem kultur *in vitro* (4). Bioreaktor RITA[®] o okresowym systemie zalewania pożywką pozwala na wzrost kultury w warunkach tlenowych oraz czasowy dostęp do składników pożywki. W literaturze donosi się o korzystnym wpływie tego typu bioreaktora na indukcję i rozwój zarodków somatycznych m. in. u narcyza, kawy i bananowca (5,6). Natomiast rośliny prowadzone w bioreaktorze RITA[®] charakteryzują się wysokim współczynnikiem namnażania, a także większą zdolnością do aklimatyzacji (7,6). Dotychczas nie opracowano sposobu mikrorozmnażania śnieżycy letniej z wykorzystaniem bioreaktora RITA[®]. Celem pracy była ocena możliwości zastosowania bioreaktora RITA[®] do namnażania kalusa embriogenicznego (charakteryzującego się słabymi zdolnościami regeneracyjnymi) oraz do indukcji, rozwoju zarodków somatycznych i regeneracji roślin śnieżycy letniej.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Materiał roślinny do badań stanowił dwuletni kalus śnieżycy letniej (*Leucojum aestivum* L.) otrzymany według procedury opisanej w pracy Ptak i Cierniak (8) na pożywce zawierającej sole mineralne według Murashige i Skoog (MS) (9) z dodatkiem 3% sacharozy, 25 μM Picloramu i 0,5 μM BA oraz 0,7% agaru. Odczyn pożywki wynosił 5,5.

2.2. Namnażanie kalusa embriogenicznego oraz indukcja zarodków somatycznych

Kalus śnieżycy letniej o masie 5 g wykładano na pożywkę stałą do płytek Petriego (kontrola) oraz do naczyń bioreaktora o okresowym systemie zalewania RITA[®]. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach. Do badań wykorzystano pożywkę MS wzbogaconą w Picloram (2, 5, 10, 25 μM) i 0,5 μM BA oraz 3% sacharozy, pH wynosiło 5,5. W każdym z naczyń znajdowało się 200 ml płynnej pożywki. Dla każdej kombinacji, różniącej się stężeniem Picloramu, ustalono dwa czasy zalewania pożywką: 5 i 15 minut. Kultury zalewane były co 2 godziny. Natomiast płytki Petriego napełniano 25 ml pożywki zestalonej agarem (0,7%). Kalus namnażano w ciemności w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$ przez 4 tygodnie.

Po upływie 4 tygodni kalus pochodzący z bioreaktora i pożywki stałej pasażowano do płytek Petriego na pożywkę agarową, zawierającą identyczne, jak we wcześniejszym etapie doświadczenia, stężenia regulatorów wzrostu.

Kultury prowadzono przez 4 tygodnie w identycznych warunkach, jak we wcześniejszym etapie doświadczenia, a następnie określono współczynnik namnażania kalusa, stosując wzór: (masa końcowa kalusa-masa początkowa kalusa)/masa początkowa kalusa oraz liczone formujące się zarodki somatyczne. Do porównań średnich wykorzystano test Duncana. Oceny istotności różnic pomiędzy średnimi dokonano przy $\alpha \leq 0,05$.

2.3. Rozwój zarodków somatycznych

Zarodki somatyczne w stadium globularnym uzyskane na pożywce MS z dodatkiem 5 μM Picloramu i 0,5 μM BA ważono i wykładano po 1g do naczyń RITA® oraz na pożywkę stałą do płytek Petriego. Doświadczenie zakładano w 5 powtórzeniach. Kultury zalewano pożywką przez 5 minut w odstępach dwugodzinnych. Stosowano pożywkę MS wzbogaconą w 0,5 μM NAA i 5 μM zeatyny, 3% sacharozy, pH pożywki wynosiło 5,8. Kultury prowadzono na świetle przy natężeniu światła 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ przez 8 tygodni. Pasaże wykonywano co 4 tygodnie. Po upływie 8 tygodni określono procentowy udział zarodków somatycznych w stadium torpedy oraz oznaczono świeżą masę każdego zarodka liścieniowego. Dla uzyskanych wartości średnich obliczono odchylenia standardowe.

2.4. Konwersja zarodków somatycznych w rośliny

Zarodki somatyczne śnieżycy letniej w stadium torpedy ważono i wykładano do naczyń RITA® oraz na pożywkę stałą do kolb. Kultury zalewano pożywką przez 5 minut w odstępach dwugodzinnych. Wykorzystano pożywkę identyczną, jak do rozwoju zarodków somatycznych. Kultury prowadzono na świetle (natężenie światła 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), w temperaturze $25\pm 2^\circ\text{C}$ przez 16 tygodni. Pasaże wykonywano co 4 tygodnie. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach. Dla każdego powtórzenia wyłożono po 10 zarodków. Po 4, 8, 12 i 16 tygodniach oznaczono średni przyrost świeżej masy zregenerowanych roślin. Dla uzyskanych wartości średnich obliczono odchylenia standardowe.

2.5. Analiza cytometryczna regeneratów

Do badań wykorzystano najmłodsze liście roślin zregenerowanych w warunkach *in vitro*. Kontrolę stanowiły liście izolowane z rośliny matecznej. Analizę wykonano przy użyciu cytometru przepływowego według metody opisaną w pracy Thiem i Śliwińska (10).

3. Wyniki i dyskusja

Po 8 tygodniach trwania kultury stwierdzono, że kalus śnieżycy letniej namnażany w bioreaktorze (5 minut zalewania pożywką) przez 4 tygodnie, a następnie przez 4 tygodnie na pożywce stałej, charakteryzował się najwyższymi współczynnikami namnażania (0,3-0,8). Najniższe współczynniki namnażania odnotowano natomiast dla kalusa rosnącego w sposób ciągły na pożywkach stałych (0,1-0,3) (tab. 1). W dostępnej literaturze informacje o namnażaniu kalusa w bioreaktorze RITA[®] są bardzo ograniczone. W obrębie rodziny *Amaryllidaceae*, do której należy śnieżycza, badania takie prowadzono jedynie dla *Narcissus pseudonarcissus* (11). W kulturach *Narcissus pseudonarcissus*, podobnie jak w tych badaniach, odnotowano wyższe przyrosty masy kalusa pochodzącego z bioreaktora RITA[®], niż z pożywek stałych.

Tabela 1

Wpływ stanu fizycznego pożywki oraz stężenia Picloramu na namnażanie kalusa śnieżycy letniej

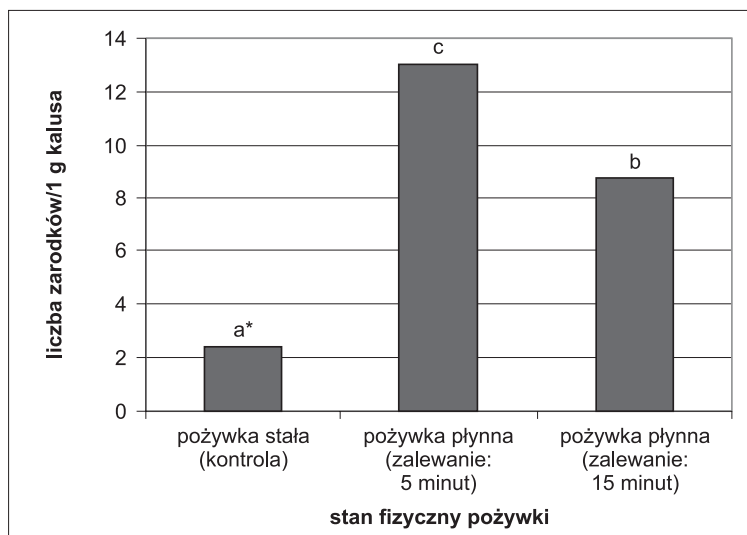
Stężenie Picloramu [μM]	Stan fizyczny pożywki		
	pożywka stała (8 tyg.)	pożywka płynna (4 tyg.), 5 min zalewania + pożywka stała (4 tyg.)	pożywka płynna (4 tyg.), 15 min zalewania + pożywka stała (4 tyg.)
2	0,25 bc*	0,75 f	0,65 e
5	0,17 ab	0,71 ef	0,64 e
10	0,18 ab	0,35 d	0,25 bc
25	0,11 a	0,29 cd	0,18 ab

*średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się między sobą istotnie przy $\alpha \leq 0,05$ wg testu Duncana.

W prezentowanych badaniach stwierdzono także, że niskie stężenia Picloramu: 2 i 5 μM wpływały korzystnie na wzrost kalusa (tab. 1). Wiadomo, że do indukcji kalusa stosuje się zazwyczaj wyższe stężenia auksyn natomiast w kolejnych etapach somatycznej embriogenezy (namnażania i indukcji zarodków somatycznych) obniża się zawartość auksyn lub całkowicie usuwa się je z pożywki (12).

Po zakończeniu 8-tygodniowego cyklu namnażania kalusa największą liczbę zarodków somatycznych odnotowano z kalusa kultywowanego w bioreaktorze RITA[®] (czas zalewania pożywką: 5 minut), a następnie pasażowanego na pożywkę stałą (średnio: 13 zarodków/1g kalusa). Najmniej zarodków powstawało natomiast z kalusa namnażanego w sposób ciągły na pożywkach stałych (średnio: 2 zarodki/1g kalusa) (rys. 1).

Bioreaktor RITA[®] jest systemem wykorzystywanym przede wszystkim do indukcji i prowadzenia kultur zarodków somatycznych (6). Zarodki somatyczne indukowano w bioreaktorze RITA[®], m. in. u takich roślin, jak: *Narcissus pseudonarcissus*,



* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się między sobą istotnie przy $\alpha \leq 0,05$ wg testu Duncana

Rys. 1. Wpływ stanu fizycznego pożywki na indukcję zarodków somatycznych śnieżycy letniej.

Citrus deliciosa, *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Musa*, *Psidium guajava* i *Saccharum* sp. (6,11,13). U wszystkich wymienionych roślin zastosowanie okresowego systemu zalewania pożywką (RITA®) zwiększało (w porównaniu do wyników otrzymanych na pożywce stałej) liczbę formujących się zarodków somatycznych z kalusa oraz poprawiało ich jakość.

Jednym z parametrów wpływających na wydajność procesu somatycznej embriogenezy w bioreaktorze RITA® jest czas zalewania kultury pożywką (13). W kulturach *Leucjum aestivum* najwięcej zarodków otrzymano stosując pięciominutowe zalewanie pożywką (rys. 1). Podobne wyniki uzyskały Malik i Molenda (13) w badaniach nad indukcją zarodków somatycznych u narcyza. Wydłużenie czasu zalewania kalusa pożywką (powyżej pięciu minut) wpływało także negatywnie na liczbę oraz jakość uformowanych zarodków somatycznych *Coffea arabica* (5).

Zarodki globularne śnieżycy letniej przekształcały się w zarodki w stadium torpedy na pożywce wzbogaconej w 0,5 μ M NAA oraz 5 μ M zeatyny. Nieznacznie wyższy procent zarodków somatycznych w stadium torpedy odnotowano w przypadku zarodków globularnych kultywowanych w bioreaktorze RITA® (tab. 2). Zaobserwowano natomiast różnice w masie otrzymanych zarodków. Zarodki rozwijające się w bioreaktorze RITA® charakteryzowały się wyższą masą niż zarodki rosnące na pożywce stałej (odpowiednio: 0,8 g i 0,6 g) (tab. 2).

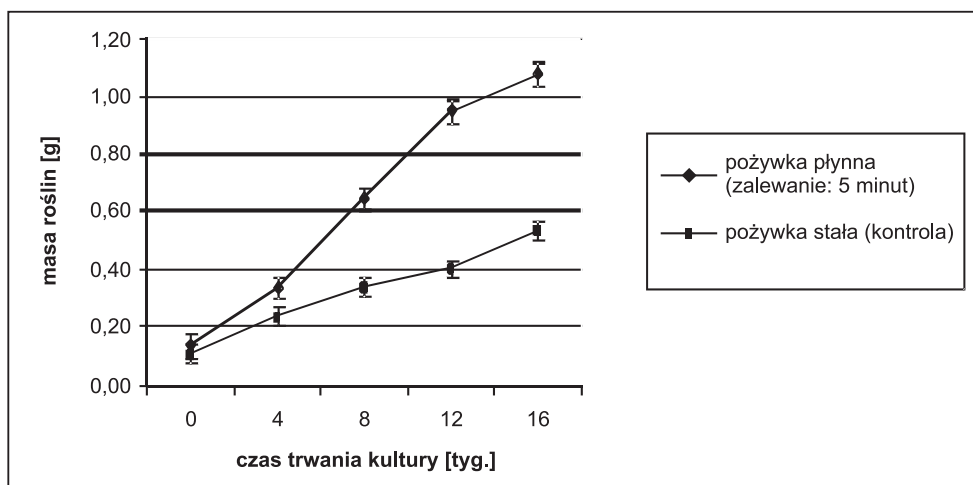
Tabela 2

Wpływ stanu fizycznego pożywki na rozwój zarodków somatycznych śnieżycy letniej

Stan fizyczny pożywki	Zarodki w stadium torpedy [%]	Masa zarodków somatycznych w stadium torpedy [g]
pożywka stała	74,5±0,2*	0,56± 0,1
pożywka płynna (zalewanie: 5 min)	89,6±0,4	0,83± 0,1

*wyniki są średnią z 5 powtórzeń ± odchylenie standardowe.

Zarodki w stadium torpedy rozwijały się w rośliny zarówno na pożywce stałej, jak i w bioreaktorze. Po 16. tygodniach obserwowano uformowane rośliny śnieżycy letniej. Wprowadzenie okresowego systemu zalewania pożywką pozwoliło jednak na otrzymanie roślin odznaczających się wydajniejszym przyrostem masy w porównaniu do roślin rosnących na pożywce stałej (rys. 2). Niezależnie od zastosowanych warunków fizycznych pożywki nie odnotowano żadnych deformacji roślin, np. staśmieni. Podobnie, jak w tej pracy, rośliny *Psidium guajava* oraz *Saccharum* sp. otrzymane w bioreaktorze RITA[®] charakteryzowały się wyższymi przyrostami masy niż rośliny prowadzone na pożywce stałej (14,15). W literaturze dostępne są także informacje na temat namnażania pędów, np. jabłoni w bioreaktorze RITA[®]. Pędy kulturowane w bioreaktorze były znacznie dłuższe niż pędy rosnące na pożywce stałej oraz łatwiej tworzyły korzenie i aklimatyzowały się (16).



* wyniki są średnią z 5 powtórzeń ± odchylenie standardowe

Rys. 2. Wpływ stanu fizycznego pożywki na przyrost masy roślin śnieżycy letniej.

W przeprowadzonych analizach cytometrycznych zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin śnieżycy letniej (w bioreaktorze oraz na pożywkach stałych) nie wykazano w testowanych próbach osobników o zmienionym stopniu ploidalności. Brak zmienności materiału zregenerowanego w kulturach *in vitro* może wskazywać na możliwość jego szerokiego wykorzystania w praktyce.

4. Podsumowanie

Zastosowanie bioreaktora o okresowym systemie zalewania (RITA®) wpływa korzystnie na nmanażanie kalusa, indukcję zarodków somatycznych oraz rozwój roślin śnieżycy letniej. Wprowadzenie takiego systemu mikrorozmnażania pozwala również na poprawę zdolności regeneracyjnych kalusa oraz na uzyskanie roślin wysokiej jakości.

Literatura

1. le Nard M., de Hertogh A., (1993), *The physiology of flower bulbs*, Eds. Le Nard M., de Hertogh A., 729-731, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.
2. Unver N., (2007), *Phytochem. Rev.*, 6, 125-135.
3. Ptak A., Tahchy A. E., Dupire F., Boisburn M., Henry M., Chapleur Y., Moś M., Laurain-Mattar D., (2009), *J. Nat. Prod.*, 72 (1), 142-147.
4. George E. F., Debergh P. C., (2008), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Eds. George E. F., Hall M. A., de Klerk G. J., 2-6, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
5. Berthouly M., Etienne H., (2005), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. Hvoslef-Eide A. K., Preil W., 165-195, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
6. Preil W., (2005), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. Hvoslef-Eide A. K., Preil W., 1-18, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
7. McAlister B. M., Finnie J., Watt M. P., Blakeway F., (2005), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. Hvoslef-Eide A. K., Preil W., 425-442, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
8. Ptak A., Cierniak O., (2003), *Biotechnologia*, 4 (63), 239-245.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
10. Thiem B., Śliwinska E., (2003), *Plant Sci.*, 164, 129-134.
11. Sage D. O., Schroeder M. B., (2002), *Int. Symp. 'Liquid Systems for in vitro Mass Propagation of Plants'*, As, Norway, (May 29th – June 2nd), abstr., 112-113.
12. Machakova I., Zazimalova E., George E. F., (2008), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 2-6, Eds. George E. F., Hall M. A., de Klerk G. J., Springer, Dordrecht, the Netherlands.
13. Malik M., Molenda A., (2008), *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 525, 237-243.
14. Kosky R. G., Perozo J. V., Valero N. A., Peñalver D. A., (2005), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. Hvoslef-Eide A. K., Preil W., 225-229, Springer, Dordrecht, the Netherlands.
15. Snyman S. J., Meyer G. M., Richards J. R., Ramgareeb S., Banasiak M., Hockett B., (2007), *South African Journal of Biology*, 73 (2), 336-337.
16. Zhu L., Li X., Welander M., (2005), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. Hvoslef-Eide A. K., Preil W., 253-261, Springer, Dordrecht, the Netherlands.