



Wpływ melatoniny na tworzenie się pędów przybyszowych róży miniaturowej White Gem w kulturach *in vitro*

Ewa Kępczyńska, Bożena Skoblińska, Jan Kępczyński

Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

The effect of melatonin on the adventitious shoot regeneration of miniature rose cv. White Gem cultured *in vitro*

Summary

The effect of melatonin (N-acetyl-methoxytryptamine), an animal hormone also present in plants, on the adventitious shoot regeneration during induction at *in vitro* micropropagation of miniature roses cv. White Gem was examined. Melatonin at concentrations 5×10^{-7} M and 5×10^{-6} M significantly increased regeneration of shoots. Although this compound has the same precursor, tryptophan, and similar chemical structure as auxins, commonly used in the micropropagation of plants, melatonin was more effective in this process than auxin, indole-3-butyric acid (IBA). In contrast to IBA, melatonin is not an inducer of the callus growth during regeneration of rose shoots. The results demonstrate that exogenous melatonin can be used in the regulation of processes in *in vitro* plant cultures. To our knowledge, these are the first data on the influence of melatonin on the adventitious shoots regeneration and callus growth.

Key words:

IBA, *in vitro* regeneration, melatonin, miniature roses cv. White Gem, micropropagation.

Adres do korespondencji

Ewa Kępczyńska,
Katedra Fizjologii
i Biotechnologii Roślin,
Wydział Nauk
Przyrodniczych,
Uniwersytet Szczeciński,
ul. Wąska 13,
71-415 Szczecin.

1. Wstęp

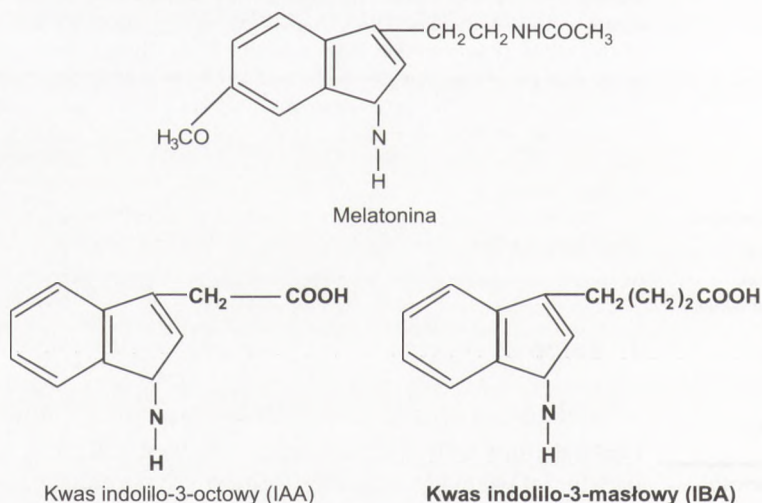
Melatonina (N-acetylo-5-metoksytryptamina), hormon zwierzęcy z grupy indoliloamin, zidentyfikowany w 1958 r., reguluje u zwierząt wiele procesów fizjologicznych przebiegających w sposób rytmiczny. Jest przekaźnikiem sygnału ciemności. Poziom

tego hormonu we krwi jest wysoki podczas nocy i zależy proporcjonalnie od jej długości, a w dzień niski (1). Dobowe zmiany stężenia melatoniny mogą służyć jako sygnał czasu, który informuje komórki o porze dnia i roku (2). Ponadto hormon ten reaguje z wolnymi rodnikami, a zatem pełni funkcję zmiatacza tych rodników (3).

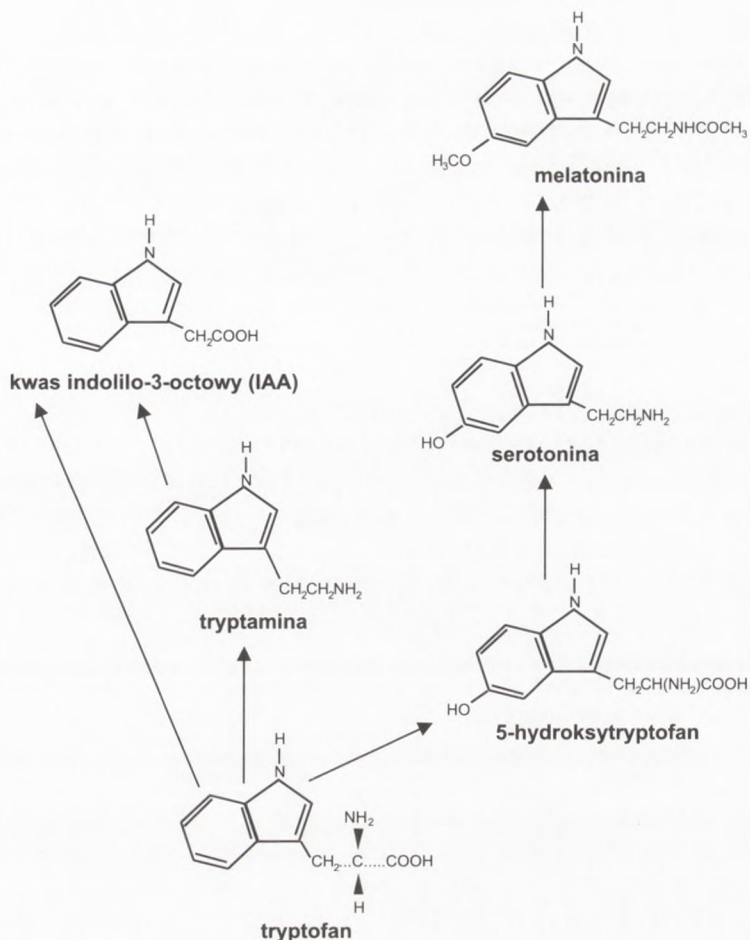
Pierwszą rośliną, u której wykryto melatoninę był glon morski *Lingulodinium polyedrum* (wcześniej zwany *Gonyaulax polyedra*) (4). Podobnie jak u zwierząt w tych fotosyntetyzujących roślinach niższych stężenie melatoniny zmienia się w cyklu dobowym, osiągając maksimum w nocy. Jej obecność stwierdzono także u roślin wyższych takich jak: *Ananas comosus*, *Asparagus officinalis*, *Chenopodium rubrum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Malus domestica*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, *Zingiber officinale* (5). Występuje ona w częściach jadalnych takich roślin jak: pomidor, banan, ogórek oraz burak (6).

W związku z podobieństwem budowy chemicznej melatoniny do powszechnie stosowanych w roślinnych kulturach *in vitro* auksyn; kwasu indolilo-3-octowego (IAA) i kwasu indolilo-3-mastowego (IBA) (rys. 1) oraz z wykorzystywaniem w roślinach wspólnego prekursora ich syntezy tryptofanu (rys. 2), interesujące było sprawdzenie czy efekt jej działania jest podobny do wymienionych regulatorów wzrostu. Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy melatonina może zastąpić auksynę stosowaną do mikrorozmnażania róży miniaturowej *Rosa x hybryda* odm. White Gem (7). Spośród wszystkich auksyn, do badań wybrano IBA, ze względu na jej największe podobieństwo w budowie strukturalnej do melatoniny.

W literaturze brak jest jakichkolwiek danych dotyczących roli melatoniny w mikrorozmnażaniu roślin w kulturach *in vitro*.



Rys. 1. Wzory strukturalne melatoniny i auksyn.



Rys. 2. Szlak biosyntezy IAA i melatoniny.

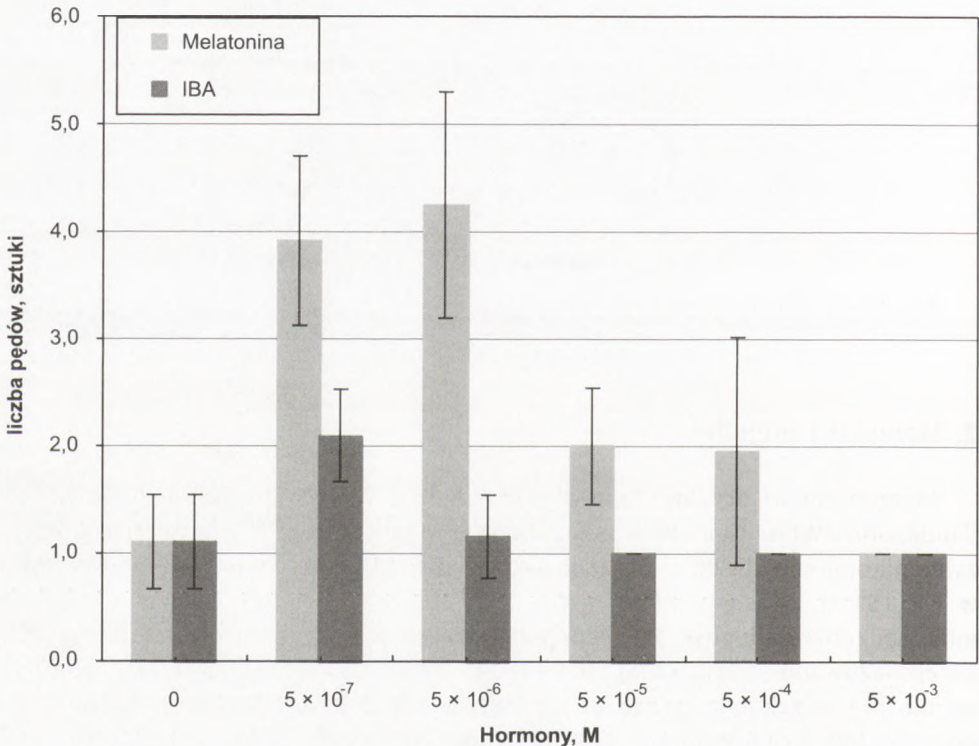
2. Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiły róże miniaturowe *Rosa x hybrida* hodowli Meilanda, odm. White Gem. Pędy mnożono *in vitro* na pożywce MS zawierającej 6-benzyloaminopurynę (BAP) w stężeniu $4,5 \times 10^{-6}$ M, kwas indolilo-3-octowy (IAA) w 2×10^{-6} M, kwas giberelinowy (GA_3) 9×10^{-7} M (7). Do doświadczeń wybierano mikrosadzonki o długości 1-1,5 cm pochodzące z 8-10-tygodniowego pasażu. Pędy przepasażowano na taką samą pożywkę MS, która zamiast IAA zawierała melatoninę lub IBA w zakresie stężeń od 5×10^{-7} M do 5×10^{-3} M. Kontrolę stanowiła pożywka bez tych hormonów. Kultury pędów inkubowano w komorze fitotronowej Sanyo w warunkach 16 h oświetlenia o natężeniu $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^2$, w temperaturze 25°C .

Ze względu na wrażliwość melatoniny na światło, słoiki przechowywano 24 h w warunkach ciemności. Przez kolejne dni słoiki były częściowo osłonięte folią aluminiową. We wcześniej wykonanych doświadczeniach wykluczono wpływ ciemności na stymulację tworzenia pędów u róży. Liczbę pędów oraz masę kalusa powstającego podczas regeneracji pędów określano po 5 tygodniach. Doświadczenie wykonano w 5 powtórzeniach, powtórzeniem był jeden słoik z 4 pędami. Do statystycznego opracowania wyników stosowano odchylenie standardowe (SD).

3. Wyniki i dyskusja

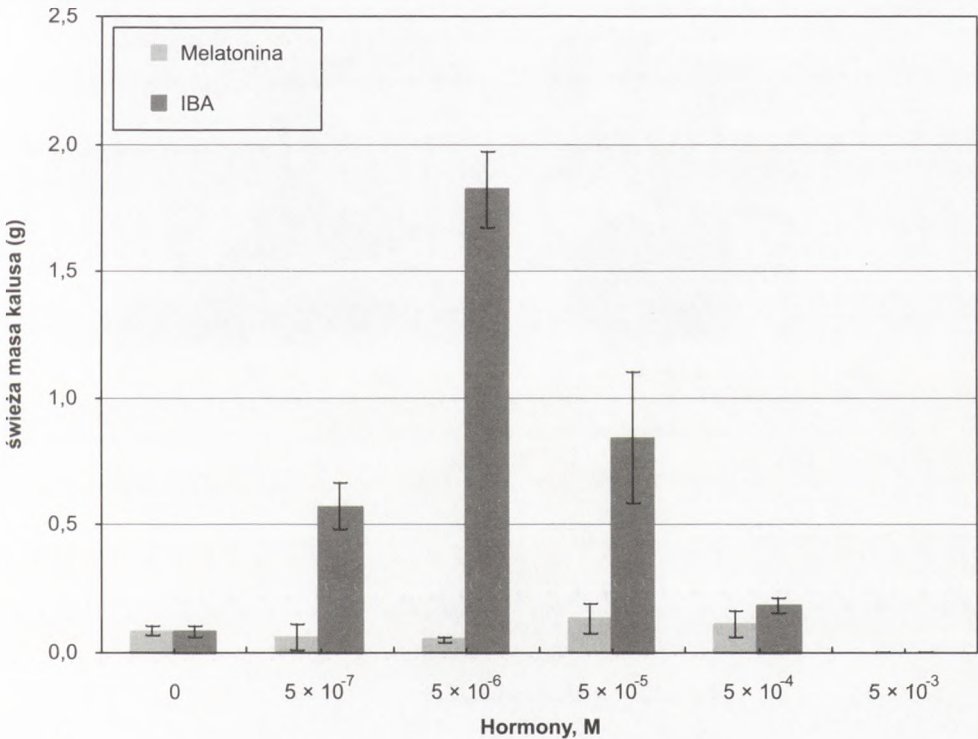
Melatonina obecna w pożywce w stężeniach 5×10^{-7} M i 5×10^{-6} M czterokrotnie zwiększała liczbę pędów przybyszowych róży (rys. 3, fot. 1 B, C) w porównaniu do liczby wytworzonych pędów na pożywce bez hormonów po 5 tygodniach kultury (rys. 3, fot. 1 A). Kwas indolilo-3-masłowy (IBA) zwiększał tylko dwukrotnie liczbę pędów i to tylko w jednym z testowanych stężeń, 5×10^{-7} M (rys. 3, fot. 1 E). IBA w stężeniu 5×10^{-6} M w przeciwieństwie do melatoniny zastosowanej w tym sa-



Rys. 3. Wpływ melatoniny i IBA na tworzenie się pędów róży miniaturowej White Gem.

mym stężeniu nie stymulował proliferacji pędów (fot. 1 F). Niewiele jest danych w literaturze na temat wpływu melatoniny na rośliny wyższe. Brak jest danych dotyczących stymulacji wzrostu, natomiast obserwowano jej hamujące działanie na wzrost wegetatywny *Arabidopsis thaliana* (8), na wzrost korzenia cebuli (9) oraz kiełkowanie nasion sałaty (10). To hamujące działanie było prawdopodobnie związane ze stosowaniem zbyt wysokich stężeń, np. u cebuli 8×10^{-4} M (11). Zwiększanie stężenia melatoniny w pożywce podczas regeneracji pędów róży miniaturowej zmniejszało jej stymulujący wpływ na ten proces; w stężeniu 5×10^{-4} M obserwowano brak wpływu (rys. 3).

Melatonina nie wpływa na wzrost kalusa u podstawy pędu róży, podczas gdy IBA jest silnym stymulatorem wzrostu tej tkanki (rys. 4, fot. 1 E, F, G). Obecność IBA w pożywce, w stężeniu 5×10^{-6} M powoduje 22-krotny przyrost świeżej masy kalusa (1,82 g) w porównaniu do kombinacji bez hormonów (0,08 g) (rys. 4). Tworzenie się kalusa podczas regeneracji pędów przybyszowych jest niekorzystne, a zatem zastosowanie melatoniny zamiast IBA nie tylko zwiększa liczbę namnożonych pędów, ale również eliminuje wzrost kalusa.



Rys. 4. Wpływ melatoniny i IBA na wzrost kalusa róży miniaturowej White Gem.



A Melatonina 0 M, IBA 0 M



B Melatonina 10^{-7} M



C Melatonina 10^{-6} M



D Melatonina 10^{-5} M



E IBA 10^{-7} M



F IBA 10^{-6} M



G IBA 10^{-5} M

Fot. 1. Wpływ melatoniny i IBA na tworzenie się pędów przybyszowych oraz kalusa róży White Gem.

Stwierdzono różną wrażliwość róży na melatoninę w zależności od fazy jej rozwoju, podczas jej regeneracji w kulturach *in vitro*; hormon ten w stężeniu 5×10^{-7} M i 5×10^{-6} M stymulował tworzenie pędów, ale nie wpływał na wzrost kalusa. Różną reakcją na melatoninę w stężeniach 10^{-4} M i 5×10^{-6} M obserwował Kolar i wsp. (11), hormon ten hamował kwitnienie *Chenopodium rubrum*, ale nie wpływał na wzrost tej rośliny.

Reasumując, na podstawie otrzymanych wyników wskazuje się na potencjalne zastosowanie melatoniny w tworzeniu pędów róży miniaturowej White Gem zamiast IBA. Są to pierwsze dane dotyczące wpływu tego hormonu na indukcję pędów przybyszowych oraz na wzrost kalusa u roślin w warunkach *in vitro*.

Literatura

1. Goldman B. D., (2001), *J. Biol. Rhythms*, 16, 283-301.
2. Arend J., (1986), *Oxford reviews of reproductive biology*, Ed. Clark J. R., 8, 266-320, Oxford University Press, Oxford.
3. Reiter R. J., (1997), *Adv. Pharmacol.*, 38, 103-116.
4. Balzer I., Hardeland R., (1991), *Science*, 253, 795-797.
5. Balzer I., Hardeland R., (1996), *Bot. Acta*, 109 (3), 180-183.
6. Dubbels R., Reiter R. J., Klenke E., Goebel A., Schnakenberg E., Ehlers C., Schiwara H. W., Schloot W., (1995), *J. Pineal Res.*, 18, 28-31.
7. Podwyszyńska M., Goszczyńska M., (1994), *Prace Ogr. Bot., PAN* 5/6, 261-266.
8. Edmonds K., Riggs N., Spurrier R., (2000), in: (eds) *Abst. Seventh Meet. Soc. Res. Biol. Rythms*, Jacksonville, FL. USA. Publ. Town., 76.
9. Banerjee S., Margulis L., (1973), *Exp. Cell Res.*, 78, 314-318.
10. van Tassel D. L., (1997), Thesis, University of California, Davis, CA, USA.
11. Kolar J., Johson C. H., Machackova I., (2003), *Physiol. Plant.*, 118, 605-612.