



## Wpływ IAA i BAP oraz warunków świetlnych na różnicowanie kalusa papryki *in vitro*

Andrzej Gatz, Marek Reinke

Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

### Effects of IAA, BAP and light conditions on differentiation of pepper callus *in vitro*

#### Summary

The aim of the presented research was to determine the changes of morphology (texture, friability, coloration), and to extend the cytodifferentiation (tracheary element differentiation), as well as growth potential of pepper (*Capsicum annuum* L.) callus in response to growth regulators (IAA, BA) and various light conditions. Callus was induced under 16-h photoperiod from embedded, mature embryos which were placed on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D. After induction, callus was transferred on MS medium with IAA and BA (0.02, 0.1, 0.5 mg/l), added alone and in combinations. The cultures were incubated both in 16-h photoperiod and darkness for 4 weeks.

Auxin stimulated the formation of smooth callus surface, while cytokinin used alone and with various concentration of auxin showed the tendency to produce nodular callus. Soft and friable calli occurred in the presence of IAA, whereas BA frequently stimulated the compact one. Light effected the reduction of cells' cohesion of calli, regarding auxin medium and the increase of cells' cohesion in the case of the highest concentration of IAA with BA combinations. Green coloration associated with chloroplast differentiation was observed mainly in callus from medium containing cytokinin alone at higher concentrations and cytokinin with auxin also at higher concentrations. The largest number of explants with xylogenesis (100%) was noted at the highest concentration of BA added alone to medium and with combinations of IAA. Three types of the tracheary element arrangements (clusters of izodiametric cells, strands and whirls of elongated cells), were observed. The most effective callus growth occurred in the darkness and the increase of callus fresh weight was about twice bigger than under the light. The best combination of PGRs in callus growth appeared to be 0.1 mg/l IAA + 0.02 mg/l BA.

#### Adres do korespondencji

Andrzej Gatz,  
Katedra Fizjologii Roślin,  
Akademia  
Techniczno-Rolnicza,  
ul. Bernardyńska 6,  
85-029 Bydgoszcz;  
e-mail:  
andgatz@atr.bydgoszcz.pl

#### Key words:

*Capsicum annuum* L., callus culture, IAA, BA, light conditions, tracheary elements.

## 1. Wstęp

Papryka jest jedną z ważniejszych roślin uprawnych na świecie, ostatnio również w naszym kraju wzrosło zainteresowanie tą rośliną. Od wielu lat badane są zdolności regeneracyjne papryki w warunkach kultur *in vitro* (1-3). Indukcja pędów przybyszowych jest stosunkowo łatwa do uzyskania, natomiast dalszy rozwój pąków pędowych i ostatecznie uzyskanie mikrosadzonek pozostają nadal mniej wydajne w porównaniu z innymi przedstawicielami rodziny *Solanaceae* (4). Alternatywnym sposobem zwiększenia tej wydajności może być metoda pośredniej regeneracji roślin poprzez kalus. Kilka lat temu w Katedrze Fizjologii Roślin podjęto badania nad określeniem potencjału morfogenetycznego i zdolności regeneracyjnych kalusa polskich odmian papryki (5,6). Praca jest kontynuacją tych badań, a jej celem było przebadanie kalusa pochodzącego z dojrzałych zarodków papryki odmiany Bryza pod kątem zmian morfologicznych, histologicznych (różnicowanie elementów trachealnych), oraz przyrostu świeżej masy w odpowiedzi na różne kombinacje stężeń IAA i BAP w warunkach światła i ciemności.

## 2. Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do otrzymania kalusa były nasiona papryki (*Capsicum annuum* L.) odmiany Bryza. Nasiona poddano powierzchniowej sterylizacji w 70% alkoholu etylowym przez minutę, a następnie w podchlorynie sodu (ACE – średnia zawartość aktywnego chloru 4,9%) przez 7 minut, po czym 3-krotnie płukano w sterylnej bidestylowanej wodzie. Sterylne nasiona poddano czterodniowej prekulturze w warunkach 16-godzinnej fotoperiodu, a jej celem było otrzymanie dobrze napęczniałych nasion. Prekultura polegała na umieszczeniu nasion na płytkach Petriego, które uprzednio wyłożono bibułą nasączoną sterylną wodą. Płytki zabezpieczono parafilmem przed nadmiernym parowaniem wody i zakażeniami. Ze spęczniałych nasion izolowano zarodki, które następnie umieszczano horyzontalnie na pożywce Murashige i Skooga (MS) (7), z dodatkiem 1 mg/l kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) w celu zaindukowania tkanki kalusowej. W ciągu 4 tygodni w warunkach oświetlenia (fotoperiod 16-godzinny), i temperaturze 25°C otrzymano duże ilości śnieżnobiałego kalusa o bardzo luźnej strukturze.

Porcje kalusa o zbliżonej objętości (średnia świeża masa 88 mg) wykładano na pożywkę MS z dodatkiem kwasu indolilo-3-octowego (IAA) i 6-benzyloaminopuryny (BAP) w stężeniach 0,02, 0,1, 0,5 mg/l pojedynczo lub w kombinacjach, przy czym całkowita liczba kombinacji wynosiła 16, łącznie z próbą kontrolną (bez regulatorów wzrostu). Kultury kalusa inkubowano na świetle (16-godzinny fotoperiod, natężenie światła 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oraz w ciemności.

Po 4 tygodniach kultury, kalus poddano analizie jakościowej (określono strukturę powierzchni, spójność komórek kalusa jego zabarwienie), i ilościowej (określono



świeżą masę kalusa oraz liczbą eksplantatów, w których zachodziła ksylogeneza). Identyfikację elementów trachealnych przeprowadzono na świeżym materiale (preparaty gniecione lub krojone ręcznie w zależności od stopnia twardości kalusa) za pomocą mikroskopu świetlnego i fluorescencyjnego. Doświadczenie wykonano w 2 powtórzeniach, przy czym na każdą kombinację regulatorów wzrostu i wariant oświetlenia przypadało 10 eksplantatów (porcji kalusa). Dane liczbowe, dotyczące przyrostu świeżej masy kalusa opracowano statystycznie za pomocą programu STATISTICA PL, określając interakcje pomiędzy badanymi czynnikami (warunki świetlne, IAA i BAP).

### **3. Wyniki i dyskusja**

Badany kalus w zależności od zastosowanych kombinacji stężeń IAA i BAP oraz warunków świetlnych wykazał zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych (struktura powierzchni, spójność komórek kalusa, zabarwienie), stopnia cytodyferencji (różnicowanie elementów trachealnych) i przyrostu świeżej masy.

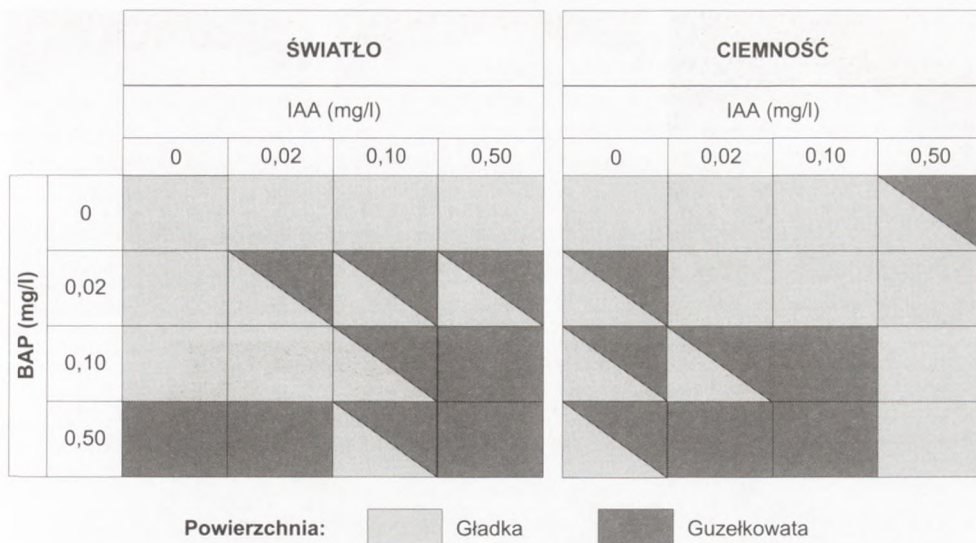
#### **3.1. Morfologia kalusa**

##### **3.1.1. Struktura powierzchni**

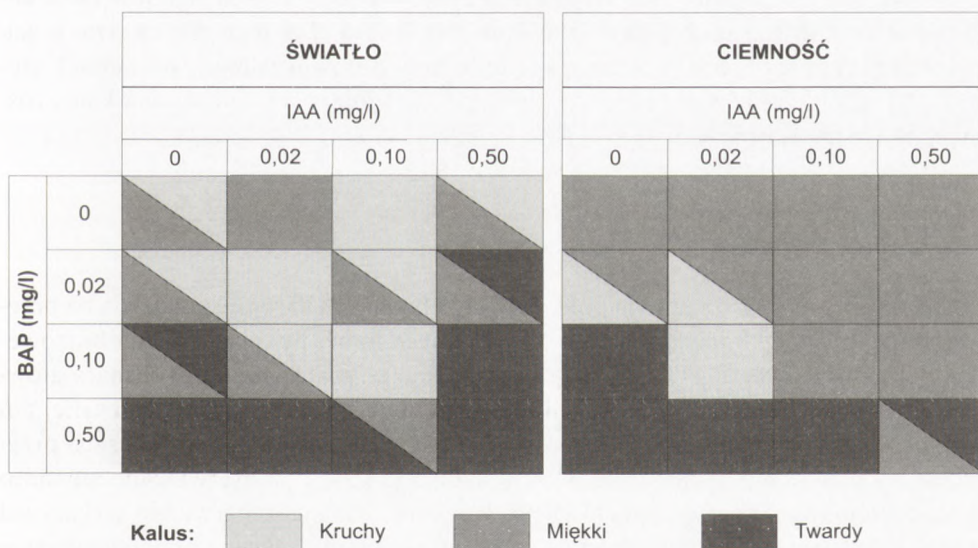
Niezależnie od warunków świetlnych i w odróżnieniu od cytokininy (BAP), auksyna (IAA) zastosowana pojedynczo w pożywce stymulowała formowanie kalusa o powierzchni gładkiej. Różnica w strukturze powierzchni kalusa w odpowiedzi na obecność lub brak światła wystąpiła przy najwyższym stężeniu IAA (0,5 mg/l) w kombinacjach z BAP. Na świetle przeważał kalus guzłkowaty natomiast w ciemności, gładki. Warunki świetlne miały również wpływ na strukturę powierzchni w przypadku pożywek zawierających samą cytokininę, tj. w ciemności kalus przejawiał większą niż na świetle tendencję do guzłkowatości (rys. 1).

##### **3.1.2. Spójność komórek**

Na świetle, w badanym zakresie spójności komórek, otrzymano w zbliżonych proporcjach kalus kruchy (34,4%), miękki (31,2%), twardy (34,4%), natomiast w ciemności najwięcej otrzymano kalusa miękkiego (54,9%), o połowę mniej twardego (28,1%) i najmniej kruchego (12,5%). W warunkach oświetlenia auksyna w niższych stężeniach stymulowała formowanie kalusa o strukturze miękkiej i kruchej natomiast w ciemności wyłącznie miękkiej. Przy najwyższym zastosowanym stężeniu

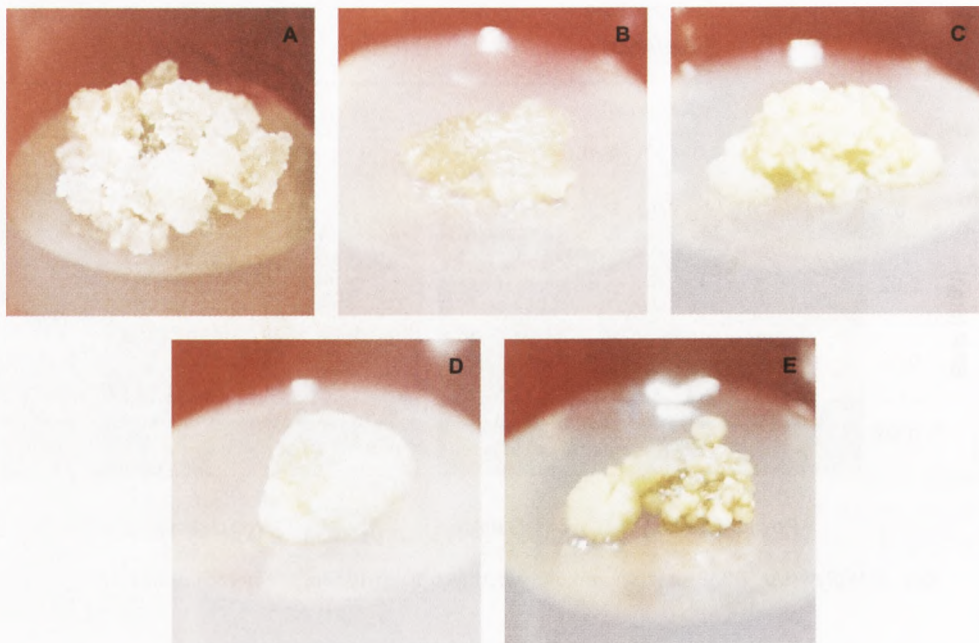


Rys. 1. Wpływ IAA i BAP oraz warunków świetlnych na strukturę powierzchni kalusa.



Rys. 2. Wpływ IAA i BAP oraz warunków świetlnych na spójność komórek kalusa.



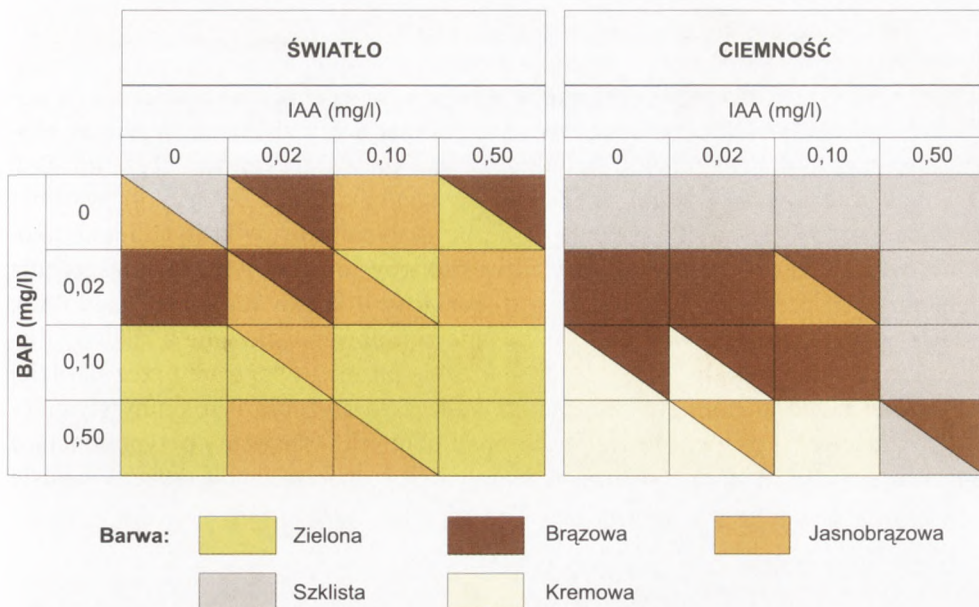


Fot. 1. Typy kalusa wyodrębnione na podstawie stopnia spójności komórek: kalus kruchy (A), miękki (B), twardy (C) oraz struktury powierzchni: kalus gładki (D), guzłkowaty (E).

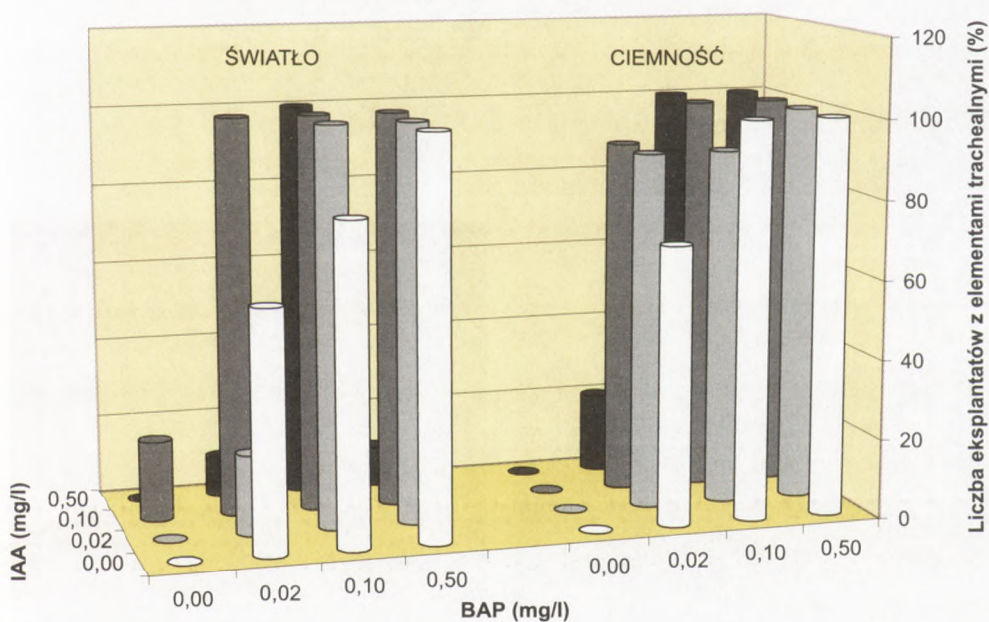
IAA (0,5 mg/l) w kombinacjach z BAP, na świetle przeważał kalus twardy, a w ciemności miękki. Cytokininą zastosowaną pojedynczo w stężeniu 0,5 mg/l BAP i w kombinacjach z auksyną powodowała powstawanie kalusa twardego tak na świetle jak i w ciemności. Kalus inkubowany na świetle przy porównywalnych wariantach stężeń IAA i BAP wykazywał tendencję do większej spójności komórek niż kalus rosnący w ciemności (rys. 2).

### 3.1.3. Zabarwienie

W obecności światła prawie połowa (44%) z badanych kalusów posiadała na przeważającej powierzchni zabarwienie zielone, nieco mniej było kalusa jasnobrązowego (36%), i brązowego (21%). Zieloną barwą charakteryzował się kalus rosnący głównie na pożywkach z wyższymi stężeniami cytokinin i to zarówno zastosowanej pojedynczo jak i w kombinacjach z auksyną. Przy braku oświetlenia, w kalusach przeważało zabarwienie szkliste (40,6%) i brązowe (31,2%), zaobserwowano ponadto barwę kremową, którą posiadało 21,9% kalusów. Szkliste zabarwienie wykazywał kalus z pożywek zawierających samą tylko auksynę bądź auksynę przy najwyższym stężeniu (0,5 mg/l IAA) w kombinacjach z cytokininą (rys. 3)



Rys. 3. Wpływ IAA i BAP oraz warunków świetlnych na barwę kalusa.

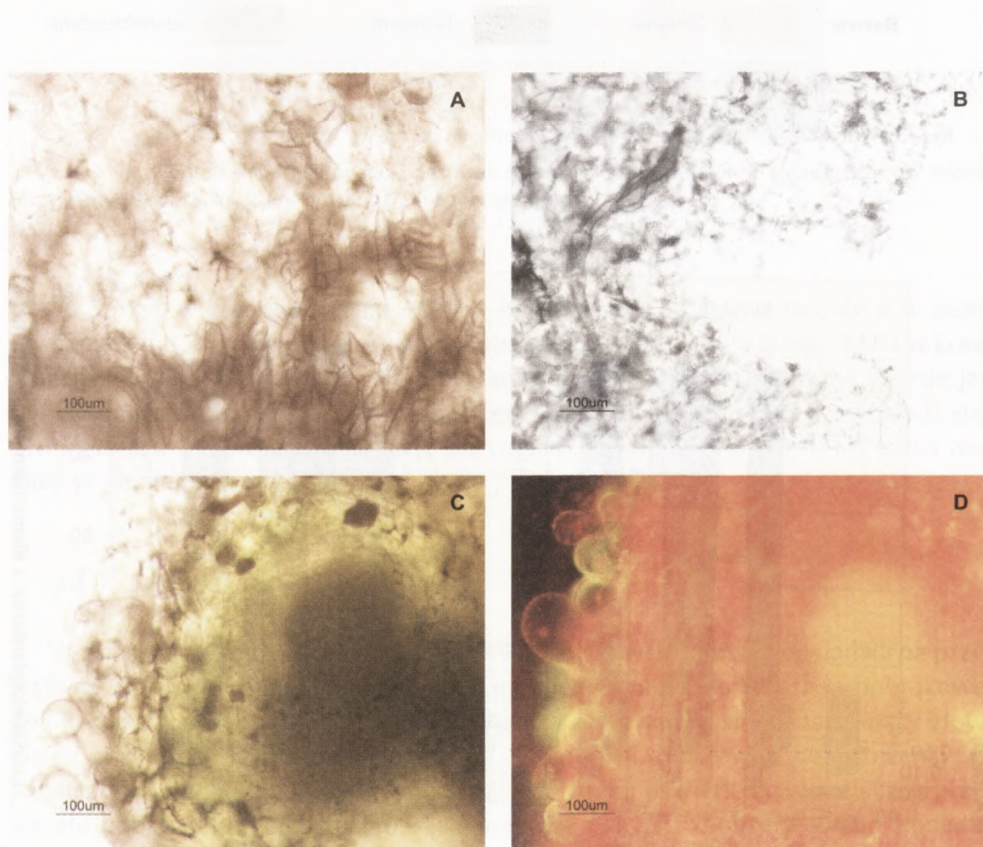


Rys. 4. Częstotliwość eksplantatów, w których stwierdzono obecność elementów trachealnych, różnicujących się pod wpływem IAA i BAP w warunkach światła i ciemności.



### 3.2. Różnicowanie się elementów trachealnych

Elementy trachealne obserwowano w kalusie rosnącym prawie wyłącznie na pożywkach zawierających cytokininę i w jej kombinacjach z auksyną. Najwięcej eksplantatów z ksylogenezą (100%), odnotowano przy najwyższym stężeniu BAP (0,5 mg/l), dodanej do pożywki pojedynczo i w kombinacjach z IAA (rys. 4). Warunki świetlne nie miały istotnego wpływu na liczbę eksplantatów, w których identyfikowano ogniska ksylogeniczne. W kalusach obserwowano trzy typy rozmieszczenia elementów trachealnych. Przy niższych stężeniach cytokinin (0,02 i 0,1 mg/l BAP), jeden typ stanowiły mniej lub bardziej owalne zgrupowania złożone z kilku izodiametrycznych komórek (fot. 2 A); drugi – krótkie pasma utworzone przez bardziej wydłużone komórki (fot. 2 B). Natomiast najwyższe stężenie cytokinin stymulowało różnicowanie elementów trachealnych, ułożonych w struktury przypominające wiry (fot. 2 C, D). Podobne rozmieszczenie wirów obserwowano także w kalusie

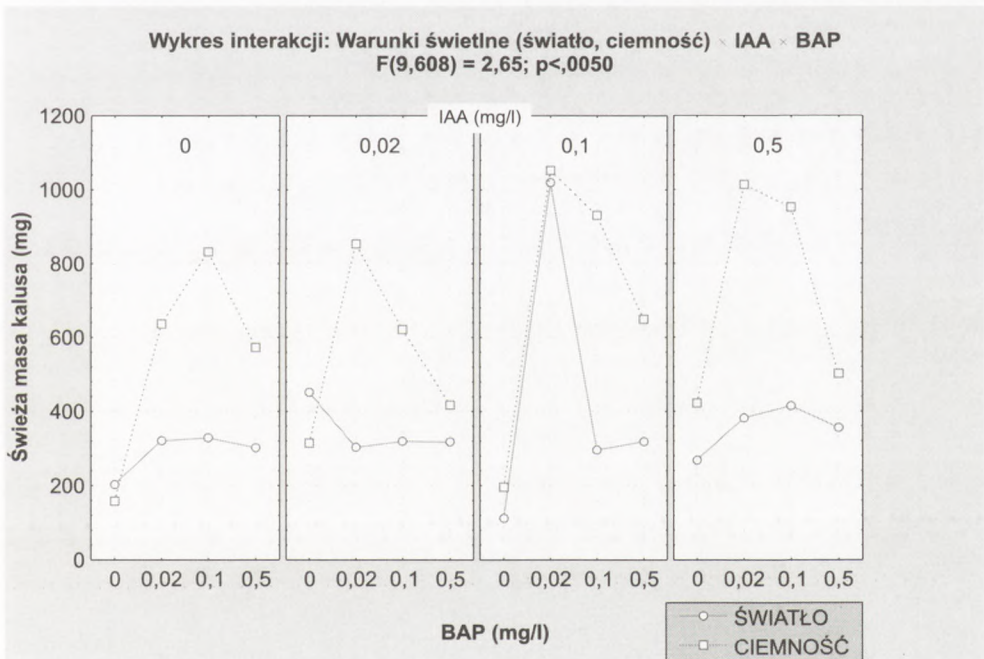


Fot. 2. Elementy trachealne wyróżniane w formie zgrupowań izodiametrycznych komórek (A), krótkich pasm (B) oraz wirów wydłużonych komórek (C i D). D – seledynowa autofluorescencja ligniny w ścianach wtórnych różnicujących się elementów trachealnych.

formującym się na eksplantatach liściennych papryki odmiany Kujawianka (8). Większość obserwowanych elementów posiadała siateczkowate zgrubienia ścian wtórnych, rzadziej spiralne.

### 3.3. Świeża masa kalusa

Wykazano istotne różnice w przyroście świeżej masy kalusa w odpowiedzi na zastosowane kombinacje stężeń regulatorów wzrostu jak i warunki świetlne. W ciemności sumaryczna świeża masa (biorąc pod uwagę wszystkie kombinacje stężeń IAA i BAP), była prawie 2-krotnie większa niż na świetle. Najefektywniejszy przyrost świeżej masy kalusa uzyskano przy kombinacji 0,1 mg/l IAA + 0,02 mg/l BAP i to zarówno na świetle jak i w ciemności. Auksyna stymulowała wzrost kalusa w wyższych stężeniach (0,1 i 0,5 mg/l IAA), szczególnie w ciemności, natomiast cytokinina przy jej najniższym stężeniu (0,02 mg/l), (rys. 5). Z kolei u tej samej odmiany papryki, kalus pochodzący z liścieni (5), przy zakresie wyższych stężeń IAA i BAP, dawał największe przyrosty na świetle, lecz także przy przewadze auksyn nad cytokininami.



Rys. 5. Wpływ warunków świetlnych (światło, ciemność), IAA i BAP na przyrost świeżej masy kalusa.



#### 4. Wnioski

1. Auksyna stymulowała tworzenie się kalusa kruchego i miękkiego o gładkiej powierzchni, natomiast w obecności cytokininy, kalus wykazywał tendencję do większej spójności komórek i guzłowatości powierzchni.

2. W ciemności kalus charakteryzował się większą spójnością komórek, jak również 2-krotnie wyższym przyrostem świeżej masy.

3. Różnicujące się w kalusie elementy trachealne najczęściej (100% eksplantatów z ksylogenezą), obserwowano w przypadku najwyższego stężenia BAP, dodanej do pożywki pojedynczo i w kombinacjach z IAA.

#### Literatura

1. Fari M., (1986), *Pepper (Capsicum annuum L.)*, in: Ed. Bajaj Y. P. S., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 2, vol. 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 345-362.
2. Harini I., Lakshmi Sita G., (1993), *Plant Science*, 89, 107-112.
3. Manoharan M., Sree Vidya C., Lakshmi Sita G., (1998), *Plant Science*, 131, 77-83.
4. Szasz A., Nervo G., Fari M., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 666-669.
5. Gatz A., Gwit P., (2000), Materiały IX Ogólnopolskiej Konferencji Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin: „Modyfikowanie genomu roślin”, Gdańsk-Sobieszewo, (10-13 września), s. 109.
6. Gatz A., (2002), Materiały 5 Ogólnopolskiej Konferencji: „Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin”, Kraków, (21-22 maja), s. 81.
7. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
8. Fraś A., Nowak K., (1995), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 64, 5-11.