



## Wpływ stężenia soli mineralnych, rodzaju czynnika zestalającego, cytokininy i TIBA na regenerację przybyszową podkładki jabłoni P.59

Katarzyna Wiejacha, Teresa Orlikowska  
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

**The effect of concentration of mineral salts, kind of solidifying agent, cytokinin and TIBA on adventitious regeneration of apple rootstock P.59**

### Summary

The aim of this investigation was to establish the conditions for effective regeneration of adventitious shoots on leaf explants of apple dwarf rootstock P.59. A three stage procedure was used – the induction on medium containing thidiazuron (TDZ) and  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) for two weeks, then the regeneration on medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and NAA and growth of adventitious shoots on medium with low concentration of BAP and indole-3-butyric acid (IBA). The youngest leaves from proliferating shoot cultures were taken as explants for adventitious regeneration. The effect of MS salt concentration and type of solidifying agent in the induction and regeneration media, and a type of cytokinin in the induction medium was studied. It was proved that the regeneration potential was higher when  $\frac{1}{2}$  MS salts, Gelrite and TDZ was used.

### Key words:

adventitious shoot regeneration, apple rootstock, induction medium.

### Adres do korespondencji

Teresa Orlikowska,  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarstwa,  
ul. Pomologiczna 18,  
96-100 Skierniewice;  
e-mail: torlikow@insad.pl

## 1. Wstęp

Współczesne programy hodowlane łączą tradycyjną hodowlę z inżynierią genetyczną. Wprowadzenie pożądaných genów w procesie transformacji genetycznej do pojedynczych komórek,

powinno zakończyć się odtworzeniem z tej komórki całej rośliny w wyniku regeneracji przybyszowej – organogenezy lub embriogenezy. Często mała efektywność regeneracji jest powodem trudności w uzyskaniu roślin transgenicznych. Zdolność do organogenezy jabłoni jest zależna od genotypu (1,2) i w wielu przypadkach wymaga specyficznych warunków. Z literatury wynika, że polecane metody regeneracji jabłoni różnią się nawet w tak podstawowych czynnikach, jak rodzaj i stężenie soli mineralnych (3,4), rodzaj cytokininy (2,5,6) oraz rodzaj czynnika zestalającego (5,7,8). Nasze doświadczenia nad regeneracją podkładek jabłoni rozpoczęto od podkładki modelowej – M.26, która tworzyła bardzo wiele pędów w szerokim zakresie warunków chemicznych. Takiej cechy nie posiadają podkładki wegetatywne polskiej hodowli, dla których należy wyselekcjonować specyficzne warunki. W tej pracy przedstawiono wyniki doświadczeń nad regeneracją podkładki P.59, w których badano wpływ stężenia soli mineralnych, rodzaju cytokininy, rodzaju czynnika zestalającego, a także kwasu trijodobenzoowego (TIBA), który w naszych doświadczeniach znacząco wydłużał okres zdolności do regeneracji róży (9).

## 2. Materiał i metody

Eksplantaty do regeneracji – najmłodsze, ale w pełni rozwinięte liście z pędów rosnących przez 4 tygodnie na pożywce do namnażania, odrywano od łodyg i wykładano na pożywkę indukcyjną, na której przebywały 14 dni (przez pierwsze 5 dni w ciemności), a następnie przenoszono je na pożywkę regeneracyjną. Liście nacinało poprzecznie przez nerw główny w odstępach co 2-3 mm i wykładano dolną stroną do pożywki. Regenerację prowadzono przy oświetleniu światłem rozproszonym o natężeniu ok.  $20 \mu\text{moli m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ . Po 2 tygodniach wycinano pędy o długości od 2 do 5 mm, a pozostałe eksplantaty inicjalne przekładano na świeżą pożywkę regeneracyjną. Taką procedurę powtórzono jeszcze raz po 4 tygodniach. Wycięte pędy umieszczano na pożywce wzrostowej, a następnie na pożywce do ukorzenia. Skład podstawowy pożywek podano w tabeli 1.

Badano wpływ na regenerację stężenia soli mineralnych – MS i  $\frac{1}{2}$  MS, rodzaju cytokininy – tidiazuron (TDZ)  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  i 6-benzyloaminopuryny (BAP)  $5 \text{ mg l}^{-1}$  oraz rodzaju czynnika zestalającego (agar Bacto  $8 \text{ g l}^{-1}$  i Gelrite  $3,2 \text{ g l}^{-1}$ ) w pożywkach indukcyjnych. Układ doświadczenia podano w tabeli 2. Drugie doświadczenie w takim samym układzie wykonano przy dodatku  $5 \text{ mg l}^{-1}$  TIBA do pożywki regeneracyjnej. Pożywki regeneracyjne miały takie samo stężenie soli mineralnych i rodzaj czynnika zestalającego, jak pożywki indukcyjne. Wszystkie pożywki indukcyjne zawierały  $1 \text{ mg l}^{-1}$  kwasu naftylo-1-octowego (NAA), a wszystkie regeneracyjne  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BAP i  $0,01 \text{ mg l}^{-1}$  NAA.

Tabela 1

Skład podstawowy pożywek stosowanych w doświadczeniach

Skład pożywki	Przeznaczenie pożywki				
	dla kultur matecznikowych	indukcyjna	regeneracyjna	wzrostowa	do ukorzenia
sole mineralne	MS (10)	MS lub ½ MS	MS lub ½ MS	MS	½ MS
witamina	WPM (11)	WPM	WPM	WPM	WPM
sacharoza (g l <sup>-1</sup> )	30	30	30	30	30
czynnik zestalający (g l <sup>-1</sup> )	Bacto 8	Bacto 8 lub Gelrite 3,2	Bacto 8 lub Gelrite 3,2	Bacto 8	bioMerieux 7
cytokinina (mg l <sup>-1</sup> )	BAP 1	TDZ 0,5 lub BAP 5	BAP 2	BAP 1	–
auksyna (mg l <sup>-1</sup> )	IAA 0,2	NAA 1	NAA 0,01	IAA 0,2	IBA 1
arginina (mg l <sup>-1</sup> )	–	–	–	–	200
floroglucyna (mg l <sup>-1</sup> )	–	–	–	–	80

Tabela 2

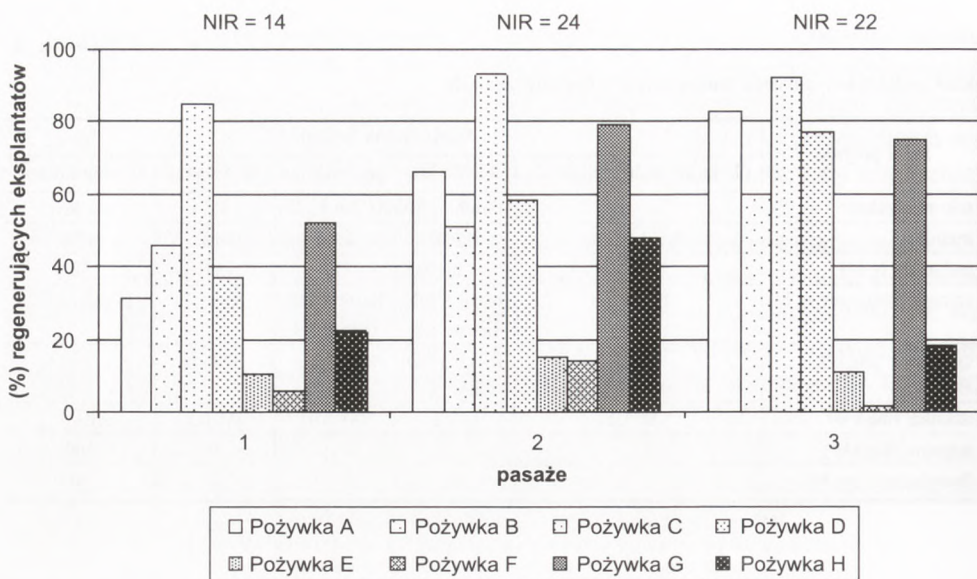
Czynniki zmienne w pożywkach indukcyjnych

Oznaczenie pożywki	Badane czynniki		
	sole mineralne	czynnik zestalający	cytokinina
A	½ MS	Bacto 8 g l <sup>-1</sup>	TDZ 0,5 mg l <sup>-1</sup>
B	½ MS	Bacto 8 g l <sup>-1</sup>	BAP 5 mg l <sup>-1</sup>
C	½ MS	Gelrite 3,2 g l <sup>-1</sup>	TDZ 0,5 mg l <sup>-1</sup>
D	½ MS	Gelrite 3,2 g l <sup>-1</sup>	BAP 5 mg l <sup>-1</sup>
E	MS	Bacto 8 g l <sup>-1</sup>	TDZ 0,5 mg l <sup>-1</sup>
F	MS	Bacto 8 g l <sup>-1</sup>	BAP 5 mg l <sup>-1</sup>
G	MS	Gelrite 3,2 g l <sup>-1</sup>	TDZ 0,5 mg l <sup>-1</sup>
H	MS	Gelrite 3,2 g l <sup>-1</sup>	BAP 5 mg l <sup>-1</sup>

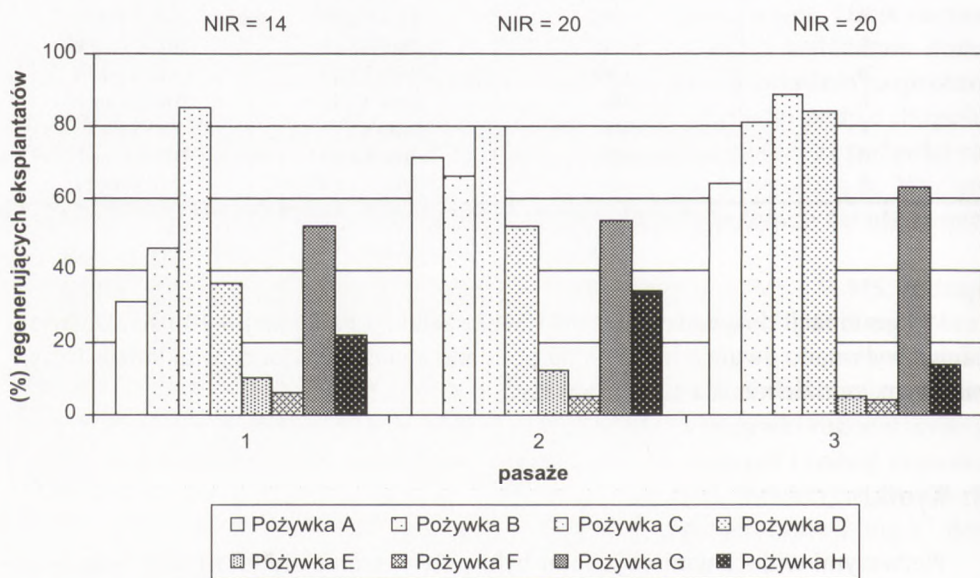
W kombinacji doświadczalnej było 5-12 szalek, a na każdej 8-10 liści. Doświadczenia wykonano dwukrotnie. Wyniki poddano analizie wariancji w układzie 1-czynnikowym, oddzielnie dla trzech pasaży.

### 3. Wyniki

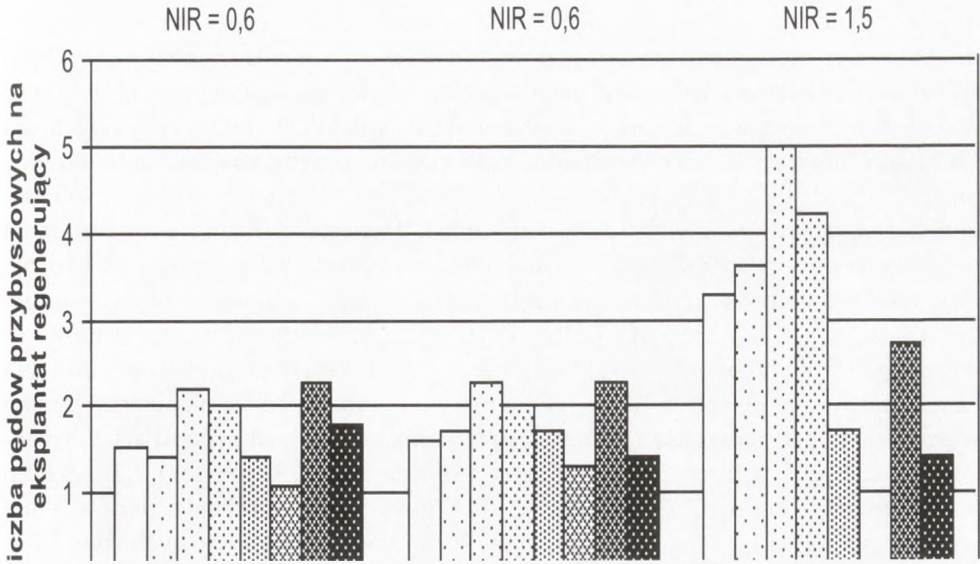
Pierwszymi widocznymi objawami było powiększanie się liści i pokrywanie powierzchni cięcia subtelną warstwą kalusa. Zaczątki pędów powstawały na powierzchni cięcia, przede wszystkim w pobliżu głównego nerwu liściowego. W każdym z trzech pasaży wyraźny był wpływ czynników głównych i brak współdziałania



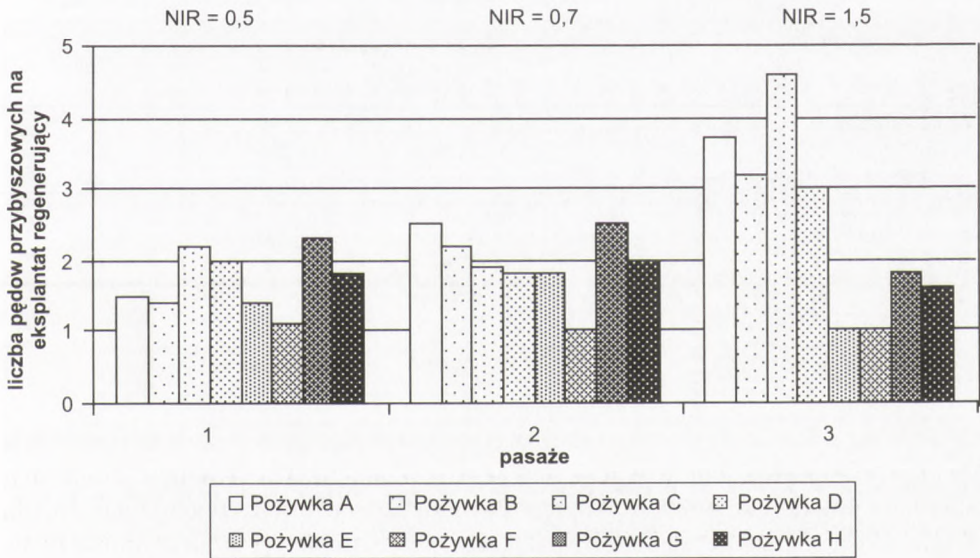
Rys. 1a. Wpływ stężenia soli MS, rodzaju czynnika zestalającego i rodzaju cytokininy w pożywce indukcyjnej na procent regenerujących eksplantatów podkładki jabłoni P.59. Pożywka regeneracyjna bez dodatku TIBA.



Rys. 1b. Wpływ stężenia soli MS, rodzaju czynnika zestalającego i rodzaju cytokininy w pożywce indukcyjnej na procent regenerujących eksplantatów podkładki jabłoni P.59. Pożywka regeneracyjna z dodatkiem  $5 \text{ m}^{-1}$  TIBA.



Rys. 2a. Wpływ stężenia soli MS, rodzaju czynnika zestalającego i rodzaju cytokininy w pożywce indukcyjnej na liczbę pędów przybyszowych na jeden eksplantat regenerujący podkładki jabłoni P.59. Pożywka regeneracyjna bez dodatku TIBA.



Rys. 2b. Wpływ stężenia soli MS, rodzaju czynnika zestalającego i rodzaju cytokininy w pożywce indukcyjnej na liczbę pędów przybyszowych na jeden eksplantat regenerujący podkładki jabłoni P.59. Pożywka regeneracyjna z dodatkiem 5 m<sup>-1</sup> TIBA.

(rys. 1 i 2). Czynnikiem najważniejszym dla regeneracji – procentu liści regenerujących oraz liczby pędów przybyszowych na jeden eksplantat regenerujący, było stężenie soli mineralnych. Udział eksplantatów regenerujących był ponad dwa razy wyższy przy stężeniu  $\frac{1}{2}$  MS niż przy pełnej dawce soli MS, zarówno przy obecności TIBA jak i bez (tab. 3). Także wartości liczby pędów przybyszowych na jeden eksplantat regenerujący były istotnie wyższe w kombinacjach zawierających  $\frac{1}{2}$  soli MS. Podobnie korzystny wpływ na regenerację miało zastosowanie Gelrite do zestalania pożywki, w porównaniu do agaru Bacto. Użyty w pożywce indukcyjnej TDZ istotnie zwiększał wydajność regeneracji w porównaniu do BAP. Optymalna pożywka indukcyjna – C, zawierała  $\frac{1}{2}$  soli MS, Gelrite i TDZ. W tej kombinacji regenerowało w kolejnych pasażach 85, 93 i 92% eksplantatów bez dodatku TIBA (rys. 1a) i 85, 80 i 89% eksplantatów w obecności TIBA (rys. 1b). Tu uzyskano także najwięcej pędów w przeliczeniu na jeden liść regenerujący (z jednym wyjątkiem). Wartości te wynosiły w kolejnych pasażach 2,2; 2,3 i 5,0 na pożywce bez TIBA (rys. 2a) i 2,2; 1,9 i 4,6 w obecności TIBA (rys. 2b). Dodatek TIBA powodował skrócenie pędów i nie wpływał na udział liści regenerujących ani liczbę pędów przybyszowych (rys. 1 i 2, tab. 3).

Tabela 3

Wpływ czynników głównych na procent regenerujących pędów i liczbę pędów z jednego liścia regenerującego podkładki jabłoni P.59

Badane czynniki	(% liści regenerujących)		Liczba pędów na liść regenerujący	
	TIBA 0	TIBA 5 mg l <sup>-1</sup>	TIBA 0	TIBA 5 mg l <sup>-1</sup>
Ilość soli mineralnych				
$\frac{1}{2}$ MS	64,7b	65,5b	2,6b	2,5b
MS	29,4a	23,5a	1,7a	1,6a
Czynnik zestalający				
Gelrite 3,2 g l <sup>-1</sup>	61,4b	55,5b	2,5b	2,3b
Agar Bacto 8 g l <sup>-1</sup>	32,7a	33,4a	1,8a	1,8a
Rodzaj cytokininy				
TDZ 0,5 mg l <sup>-1</sup>	57,7b	51,3b	2,3b	2,3b
BAP 5 mg l <sup>-1</sup>	36,4a	37,6a	1,9a	1,9a

#### 4. Dyskusja

Chociaż warunki regeneracji *in vitro* pędów przybyszowych zostały opisane wiele lat temu (12), to wiadomo, że mają one zastosowanie przede wszystkim do genotypów modelowych. Wiele czynników może modyfikować proces regeneracji (13,14), w tym rodzaj i stężenie regulatorów wzrostu, soli mineralnych oraz czynnika zestalającego. Dla rodzaju *Malus* rośliną modelową jest podkładka jabłoni M. 26, która bardzo łatwo tworzy zarówno pędy kątowe, jak i przybyszowe. W naszych wstępnych doświadczeniach (wyniki nie opublikowane) wykazaliśmy, że regeneracja

z eksplantatów M.26 jest możliwa w szerokim zakresie warunków. Wydajność innych podkładek wegetatywnych jest znacznie niższa.

Wszystkie trzy badane przez nas czynniki modyfikowały wydajność regeneracji podkładki P.59. Podobnie duży wpływ miało obniżenie stężenia soli mineralnych i użycie do zestalania pożywki Gelrite. Żywienie mineralne eksplantatów ma duże znaczenie dla każdego rodzaju kultury – stwierdzono także jego wpływ na zdolność morfogenetyczną (15). W regeneracji jabłoni najczęściej stosowane były sole MS w pełnej koncentracji (1,16), z modyfikacjami dotyczącymi poszczególnych soli (4), ale dobre wyniki uzyskiwano także na pożywce N6 (17,18). Zdecydowanie lepsze wyniki regeneracji gruszy na pożywkach zawierających  $\frac{1}{2}$  lub  $\frac{1}{4}$  soli MS, w porównaniu do pełnej koncentracji soli uzyskali Chevreau i wsp. (3).

Wpływ czynników zestalających był wielokrotnie badany, szczególnie w kulturach prowadzonych w celu mikrorozmnażania (19,20). Czynniki zestalające decyduje o sile osmotycznej pożywki i dostępności rozpuszczalnych składników pożywki, w tym regulatorów wzrostu (21). Wraz z nim wnoszone są poza kontrolą do pożywki sole mineralne i związki organiczne (19,22). Gelrite jest substytutem agaru i znane są przykłady jego pozytywnego, jak i negatywnego wpływu na jakość i wydajność kultur roślinnych (23,24). Zastosowany we właściwym stężeniu udostępnia lepiej wodę tkankom, a przez to także zawarte w niej rozpuszczalne składniki pożywki. Znaczenie Gelritu w regeneracji jabłoni podkreślali Pawlicki i Welander (8), de Bondt i wsp. (5). Szczególne znaczenie ma substancja żelująca w odniesieniu do stężenia cytokin w pożywce (25).

TDZ jest znanym czynnikiem stymulującym regenerację, szczególnie skutecznym dla roślin drzewiastych (26). Mechanizm działania tego związku w odniesieniu do regeneracji nie został ostatecznie wyjaśniony (27). Z licznych doniesień wynika, że jego stosowanie powinno być precyzyjne, ponieważ zjawiska towarzyszące użyciu tego czynnika, to deformacje i nadmierne uwodnienie. Z tego powodu TDZ powinien być używany raczej na etapie indukcji organogenezy niż właściwej regeneracji. W taki sposób został użyty z dobrym skutkiem w omawianych tu doświadczeniach.

Regeneracja przybyszowa jest używana w celu uzyskania nowych genotypów w wyniku utrwalenia spontanicznych lub indukowanych zmian genetycznych w pojedynczych komórkach. Otrzymanie pędu z pojedynczej komórki w ciągu 4 tygodni raczej nie jest możliwe, szczególnie w warunkach presji selekcyjnej towarzyszącej transformacji. Dlatego jest ważne, aby opracować metodę, która zapewnia utrzymanie się potencjału regeneracyjnego przez dłuższy czas. Zwracali na to uwagę m.in. Rugini i Mugu (4). W literaturze można spotkać doniesienia dokumentujące długotrwałą regenerację, którą oceniano po 8, a nawet więcej, tygodniach. W tych pracach nie usuwano jednak pędów wytworzonych na inicjalnych eksplantatach, co umożliwiałoby zniekształcenie wyników wydajności regeneracji przybyszowej poprzez równoczesną stymulację rozkrzewiania. Chevreau i wsp. (3) ograniczyli ocenę tylko do określenia procentu regenerujących eksplantatów słusznie uważając, że po 4 miesiącach można spotkać w kulturze zarówno pędy powstałe w wyniku niezależ-

nej regeneracji przybyszowej, jak i rozkrzewiania oryginalnych regenerantów. W tej pracy, pomimo że regenerację prowadzono przez 12 tygodni, problem niepewności co do pochodzenia pędów został znacznie zredukowany przez ich wycinanie co 4 tygodnie.

Podsumowując podane badania możemy stwierdzić, że zastosowanie sekwencji pożywek – indukcyjnej i regeneracyjnej, zawierających  $\frac{1}{2}$  soli mineralnych MS, witamin WPM, 30 g l<sup>-1</sup> sacharozy, zestalonych 3,2 g l<sup>-1</sup> Gelrite z dodatkiem 0,5 mg l<sup>-1</sup> TDZ i 1 mg l<sup>-1</sup> NAA w czasie indukcji oraz 2 mg l<sup>-1</sup> BAP i 0,01 mg l<sup>-1</sup> NAA w czasie regeneracji może być polecane do regeneracji przybyszowej karłowej podkładki jabłoni P.59.

Autorki składają podziękowania Pani Lucynie Ogórek za pomoc techniczną oraz Pani mgr Janinie Zwierz za pomoc przy analizach statystycznych.

Doświadczenia były prowadzone w ramach Akcji COST 843 i dofinansowane przez KBN.

## Literatura

1. Hanke V., Rohde A., Grafe C., (1991), *Gartenbauwissenschaft*, 56, 214-220.
2. Sarwar M., Skirvin R. M., (1997), *Scientia Horticulturae*, 68, 95-100.
3. Chevreau E., Skirvin R. M., Abu-Qaoud H. A., Korban S. S., Sullivan J. G., (1989), *Plant Cell Reports*, 7, 688-691.
4. Rugini E., Muganu M., (1998), *Plant Cell Reports*, 17, 581-585.
5. de Bondt A., Eggermont K., Penninckx I., Goderis I., Broekaert W. F., (1996), *Plant Cell Reports*, 15, 549-554.
6. Puite K. J., Schaart J. G., (1996), *Plant Sci.*, 119, 125-133.
7. Sedira M., Holefors A., Welander M., (2001), *Plant Cell Reports*, 20, 517-524.
8. Pawlicki N., Welander M., (1994), *J. Hort. Sci.*, 69, 687-696.
9. Kucharska D., Orlikowska T., (2003), *Mat. Symp. EUCARPIA „Molecular versus classical breeding”*, (August 25-29), Freising.
10. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
11. Lloyd G., McCown B., (1980), *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
12. Skoog F., Miller W., (1967), *Symp. Exp. Biol.*, 11, 118.
13. Christianson M. L., Warnick D. A., (1988), *HortScience*, 23, 515-519.
14. Orlikowska T., (1997), *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, 50, 99-110.
15. Leifert C., Murphy K. P., Lumsden P. J., (1995), *Critical Rev. Plant Sci.*, 14, 83-109.
16. Korban S. S., Chen H., (1992), in: Eds. Hammerschlag F., Litz R. E., *Biotechnology of perennial fruit crops*, CAB International, Wallingford, New York, 203-207.
17. Fasolo F., Zimmerman R. H., Fordham I., (1989), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 16, 75-87.
18. Liu Q., Salih S., Hammerschlag F., (1998), *Plant Cell Reports*, 18, 32-36.
19. Scholten H. J., Pierik R. L. M., (1998a), *Plant Cell Reports*, 17, 230-235.
20. Scholten H. J., Pierik R. L. M., (1998b), *Scientia Horticulturae*, 77, 109-116.
21. Debergh P. C., (1983), *Physiol. Plant.*, 59, 270-276.
22. Orlikowska T., Olszewski T., (1993), *J. Fruit Ornamental Plant Res.*, 1, 115-125.
23. Scherer P. A., (1988), *Acta Horticulturae*, 226, 107-114.
24. Scherer P. A., Muller E., Lippert H., Wolff G., (1988), *Acta Horticulturae*, 226, 655-658.
25. Pasqualetto P. L., Zimmerman R. H., Fordham I., (1986), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 111, 976-980.
26. Huetteman C. A., Preece J. E., (1993), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 33, 105-119.
27. Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K., (1998), *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*, 34, 267-275.