



Inicjacja kultur kalusowych chryzantemy (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

Danuta Kulpa, Danuta Rzepka-Plevneš, Jadwiga Kurek
Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Akademia Rolnicza, Szczecin

The initiation of the callus cultures of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

Summary

The aim of the work was to determine the influence of the kind of the explant, of the growth and light regulators on the initiation of the callus cultures of chrysanthemum. For the of the initiation callus cultures some parts of the inflorescence (ray flowers, flower bottom) and parts of the leaf blade of the 'Erica' variety of chrysanthemum were used. The explants placed on the MS medium were supplemented with auxins (1 mg·dm⁻³ IAA, IBA, NAA and 2.4D) or with a combination of auxin NAA (from 1.0 to 5.0 mg · dm⁻³) and cytokinin BAP (from 0,1 do 2 mg · dm⁻³). Half of the cultures were carried out in the light of the intensity of 50 PAR, while the other half was carried out in the dark.

The obtained results showed that in the case of the studied variety of chrysanthemum both the explants of the leaves and the selected parts of the inflorescence constitute good initial material for induction of callus. A positive effect of the light on the initiation of the culture, no matter what explant was used to set it up, was also observed. In the case of the 'Erica' variety of chrysanthemum, the largest weight of the formed callus, no matter what explant was used, was obtained in the MS medium with cytokinin BAP (2 mg · dm⁻³) and an auxin NAA (1 mg · dm⁻³).

Key words:

Dandranthema, callus culture, growth regulators.

Adres do korespondencji

Danuta Kulpa,
Zakład Hodowli Roślin
Ogrodniczych,
Akademia Rolnicza,
ul. Janosika 8,
71-424 Szczecin.

1. Wstęp

Celem badań było określenie optymalnych warunków indukcji kultur kalusowych i doboru odpowiednich eksplantatów pierwotnych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora*

Tzvelev), rośliny o dużym znaczeniu gospodarczym w większości krajów europejskich. Zaciekawienie kulturami kalusowymi wynika z coraz większego zainteresowania producentów rozmnażaniem roślin poprzez nasiona somatyczne (1-3). Możliwość tworzenia zarodków somatycznych i regeneracji organów przybyszowych w kulturach kalusowych, jak się wydaje, jest jedną z najbardziej obiecujących metod biotechnologicznych.

Najtrudniejszą fazą kultur kalusowych jest ich inicjacja i stabilizacja. Na końcowy efekt kultury składa się szereg czynników, z których do najistotniejszych należą: skład pożywki, czas i intensywność naświetlania oraz wybór rodzaju eksplantatu pierwotnego (4).

Fragmentami inicjalnymi do założenia kultur są zwykle części blaszki liściowej (5,6) lub pędu (7,8). Równie cennymi eksplantatami, jak się wydaje, mogą się stać części kwiatostanów – kwiaty jęczyczkowate i dno kwiatowe. W badaniach Tanaki i in. (3) nad somatyczną embriogenezą u chryzantemy, kultury kalusowe wyprowadzone z części kwiatostanów wykazują szczególnie dużą zdolność do tworzenia zarodków somatycznych. Praca ta stanowi wstęp do badań nad somatyczną embriogenezą chryzantemy. Określono w niej wpływ rodzaju eksplantatu pierwotnego, regulatorów wzrostu i światła na inicjację kultur kalusowych chryzantemy.

2. Materiał i metody badań

Materiałem badawczym była odmiana chryzantemy z grupy GardenMums – ‘Erica’, o żółtych kwiatostanach. Do założenia kultur kalusowych wykorzystano części kwiatostanów (kwiaty jęczyczkowate i dno kwiatowe) oraz fragmenty blaszki liściowej o wielkości 1 cm². Pobierano je z fragmentów roślin matecznych odkażonych poprzez płukanie przez 15 minut w wodzie destylowanej, a następnie zanurzenie w 70% alkoholu etylowym na 30 sekund oraz moczenie przez 15 minut w 3,5% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl).

Eksplantaty pierwotne wykładano na pożywki MS (9) uzupełnione auksynami (po 1 mg · dm⁻³ IAA, IBA, NAA i 2,4D) lub kombinacją auksyny NAA (1,0 i 5,0 mg · dm⁻³) i cytokininy BAP (od 0,1 do 2 mg · dm⁻³). Na każdą pożywkę wyłożono po 60 eksplantatów z każdej grupy (kwiaty jęczyczkowate, dno kwiatowe i fragmenty blaszki liściowej). Połowę kultur prowadzono w świetle o natężeniu 50 PAR i długości dnia 16 h, połowę w ciemności. Etap inicjacji przebiegał w temperaturze 24 ± 1°C. Po 4 tygodniach od założenia kultury przeprowadzono obserwacje, określając masę (g) i strukturę wykształconego kalusa. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji dla doświadczenia trójczynnikowego. Dla oceny różnic między średnimi zastosowano test Tukeya. Średnie różniące się istotnie (przy $\alpha = 0,05$) oznaczono w tabeli kolejnymi literami alfabetu.

Tabela

Średnia masa kalusa (x) wykształcona przez różne eksplantaty w zależności od zastosowanych w doświadczeniu regulatorów wzrostu

Warunki świetlne	Regulatory wzrostu (mg · dm ⁻³)												Średnia
	1,0 IAA	1,0 IBA	1,0 AA	1,0 2-4D	1,0 NAA 0,1 BAP	1,0 NAA 1,0 BAP	1,0 NAA 2,0BAP	5,0 NAA 0,1 BAP	5,0 NAA 0,2 BAP	5,0 NAA 1,0 BAP	5,0 NAA 2,0 BAP		
Kwiaty języczkowate													
kultury oświetlone	0,00 f	0,00 f	0,00 f	0,00 f	0,24 de	0,36 c	0,90 a	0,19 e	0,36 c	0,31 cd	0,70 b	0,28 a	
kultury nieoświetlone	0,00 f	0,00 f	0,00 f	0,00 f	0,18 e	0,11 e	0,83 a	0,20 e	0,41 bc	0,33 cd	0,46 b	0,25 b	
x	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,21 d	0,24 cd	0,87 a	0,20 d	0,39 c	0,32 c	0,58 b	0,27 c	
Dno kwiatowe													
kultury oświetlone	0,37 d	0,60 c	0,79 c	0,37 d	0,65 c	1,23 b	1,76 a	0,47 d	0,56 cd	0,49 d	1,56 b	0,80 a	
kultury nieoświetlone	0,31 d	0,50 c	0,48 c	0,40 cd	0,52 c	1,23 b	1,72 a	0,41 c	0,62 d	0,24 d	1,52 b	0,72 a	
x	0,34 c	0,55 c	0,64 c	0,39 c	0,59 c	1,23 b	1,74 a	0,44 c	0,44 c	0,37 c	1,48 b	0,74 b	
Fragmenty blaszki liściowej													
kultury oświetlone	0,40 e	0,65de	0,74d	0,73d	0,81 d	1,43 b	1,90 a	0,47 e	0,97 cd	1,33 bc	1,60 ab	1,00 a	
kultury nieoświetlone	0,38 b	0,52b	0,57 b	0,45b	0,58 b	0,61 b	1,63 a	0,55 b	0,17 b	0,64 b	0,53 b	0,60 b	
x	0,39 c	0,59 c	0,66 c	0,59 c	0,70 c	1,02 b	1,77 a	0,51 c	0,57 c	0,99 b	1,07 b	0,80 a	

a,b,c – średnie oznaczone różnymi literami alfabetu różnią się istotnie.

3. Wyniki

Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, że fragmenty liści należą u chryzantemy wielkokwiatowej do organów najłatwiej formujących kalus i to niezależnie od zastosowanej kombinacji regulatorów wzrostu. Inicjowały one dobrze wytwarzanie kalusa na wszystkich typach pożywek, w ciemności i na świetle (tab.). Natomiast eksplantaty z kwiatów języczkowatych posiadały taką zdolność tylko w obecności auksyny NAA i cytokiny BAP.

Tworzenie się tkanki kalusowej zależało nie tylko od rodzaju eksplantatu pierwotnego chryzantemy użytego do założenia kultury, ale przede wszystkim od zastosowanych do jej inicjacji regulatorów wzrostu (tab.). Dodanie do pożywki wyłącznie auksyny nie inicjowało tworzenia się kalusa na eksplantatach pobranych z kwiatów języczkowatych. Zdolnością do tworzenia kalusa w obecności różnych rodzajów auksyny charakteryzowały się eksplantaty z fragmentów liści oraz dna kwiatowego. Wykształciły one największą ilość kalusa, od 0,79 do 0,48 g, na pożywce z dodatkiem auksyny NAA (kwasu naftylo-1-octowego), najmniej z IAA – od 0,31 do 0,40 g (tab.).

W przypadku połączenia auksyny NAA z cytokinina BAP nieodróżnicowane komórki kalusa otrzymano na wszystkich trzech typach eksplantatów. Jego inicjacja i masa zależała od ilości i proporcji obu tych regulatorów w pożywce. Sprzyjały one formowaniu się na eksplantatach większej, niż w obecności tylko auksyny, liczby komórek kalusa. Największą masę kalusa otrzymano na pożywce zawierającej $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ auksyny NAA i $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ cytokininy BAP. Wynosiła ona, w zależności od czynnika świetlnego od 0,83 do 0,90 g dla kwiatów jęczminkowatych i od 1,72 do 1,76 g – dla fragmentów dna kwiatowego. Najwięcej tkanki kalusowej otrzymano na fragmentach blaszki liściowej (od 1,63 do 1,90 g). Natomiast najmniej, w przypadku eksplantatów wyłożonych na pożywki zawierające od 0,1 do 0,2 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (tab.).

Warunki fizyczne kultury (światło i ciemność) miały istotny wpływ na formowanie się kalusa w przypadku eksplantatów pobranych z fragmentów liści i kwiatów jęczminkowatych chryzantemy. Światło wpływało dodatnio na rozwój tkanki kalusowej, niezależnie od zastosowanych w doświadczeniu regulatorów wzrostu (tab.). Wyższą masę wykształconego kalusa stwierdzono również w większości kombinacji pożywek dla eksplantatów z dna kwiatowego chryzantemy, jednak różnice nie zostały potwierdzone statystycznie.

Kalus zainicjowany na eksplantatach z fragmentów dna kwiatowego i liści chryzantemy, charakteryzował się intensywną zieloną barwą i guzłkowatą strukturą. Świadczyło to o jego zdolności do morfogenezy. Nie stwierdzono u chryzantem różnic w wyglądzie kalusa otrzymanego na eksplantatach pierwotnych pobranych z dna kwiatowego i liści. W kulturach fragmentów liści, prowadzonych na świetle zielona barwa kalusa była bardziej intensywna, od kultur inicjowanych do wzrostu w ciemności. Ponadto w kulturach oświetlonych, na pożywkach o stężeniu cytokininy BAP $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wytworzony kalus był mozaikowaty z pomarańczowymi, brunatnymi i żółtymi sektorami komórek. W czwartym tygodniu prowadzenia kultury obserwowano brunatnienie i zamieranie tkanki kalusowej. Tempo zamierania zależało od kombinacji pożywki i rodzaju eksplantatu.

4. Dyskusja

Jednym z czynników powodzenia inicjacji kultur kalusa, jest dobór odpowiedniego składu pożywki, a przede wszystkim dawki i rodzaju roślinnych regulatorów wzrostu. Według Orlikowskiej (10) kalus może rosnąć na pożywkach z dodatkiem auksyn, jako jedyne regulatora wzrostu. Wymagane minimum do zainicjowania tworzenia się kalusa zdaniem wymienionej autorki wynosi $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Prezentowane w pracy wyniki badań, są jednak zgodne z sugestią Malaure i in. (11). Zdaniem tych autorów lepszą indukcję tkanki kalusowej w przypadku chryzantem uzyskuje się, gdy eksplantaty wykładane są na pożywki uzupełnione kombinacją auksyn z cytokiniami. Stwierdzono w nich, że auksyna NAA w połączeniu z cytokinina BAP stymuluje tworzenie się kalusa niezależnie od rodzaju eksplantatu.

W efekcie na tego typu pożywkach otrzymano większą, niż w obecności tylko auksyny, masę kalusa.

Uzyskane przez nas wyniki badań własnych są również potwierdzeniem obserwacji Tanaki i in. (3). Autorzy ci stwierdzili, że pożywki wzbogacone w auksynę NAA (o stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i cytokininę BAP, o stężeniu powyżej $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ stymulowały tworzenie się tkanki kalusowej na eksplantatach chryzantemy. Natomiast zmniejszenie ilości cytokininy, poniżej wymienionej dawki powodowało indukcję pędów przybyszowych, a jej brak – regenerację tylko korzeni.

Również Bhattacharya i in. (12) w badaniach nad rozmnażaniem w kulturach *in vitro* *Chrysanthemum morifolium* wykazali, że auksyna w połączeniu z cytokininą BAP w ilości $5,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ indukuje formowanie się kalusa na eksplantatach z fragmentów liści.

Szczególnie ważne w odniesieniu do kultur *in vitro* jest powiązanie wpływu światła z poziomem endogennych regulatorów wzrostu. Według Latkowskiej i Chmiela (13) odpowiednio dobrane dla kultur *in vitro* warunki świetlne mogą przyczynić się do zwiększenia wydajności rozmnażania, przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości stosowanych egzogennych regulatorów wzrostu. W badaniach własnych stwierdzono, że w przypadku eksplantatów z kwiatów języczkowatych i fragmentów liści chryzantemy wyższą masę kalusa można otrzymać stosując 16-godzinne naświetlanie kultur, światłem o natężeniu $50 \text{ PAR} (\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1})$.

5. Wnioski

1. Fragmenty kwiatostanów (dno kwiatowe, kwiaty języczkowate) oraz liści mogą stanowić materiał wyjściowy do założenia kultur kalusowych chryzantemy.

2. Eksplantaty liściowe należą u chryzantemy wielokwiatowej do organów najlepiej formujących kalus.

3. Pożywką, na której eksplantaty wykształciły największą masę kalusa, niezależnie od zastosowanego rodzaju eksplantatu pierwotnego była pożywka MS, uzupełniona $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ cytokininy BAP i $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ auksyny NAA.

4. Najwyższą masę kalusa otrzymano w kulturach prowadzonych przy 16-godzinnym oświetlaniu, światłem o natężeniu $50 \text{ PAR} (\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1})$.

Literatura

1. May R. A., Trigiano R. N., (1991), J. Amer. Hort. Sci., 116(2), 366-371.
2. Pavingerova D., Dostal J., Biskova R., Benetka V., (1994), Plant Sci., 97, 95-101.
3. Tanaka K., Kanno Y., Kudo S., Suzuki M., (2000), Plant Cell Rep., 19, 946-953.
4. Earle E. D., Langerhans R. W., (1974), J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99, 128-132.
5. Hill G. P., (1964), Physiol. Plant., 21, 386-389.
6. Earle E. D., Langhans R. W., (1974), Hort. Sci., 7, 289-290.
7. Jerzy M., Lubomski M., (1989), Ogrodnictwo, 5, 24-27.

8. Rout G. R., Das P., (1997), *Sci. Hort.*, 69, 239-257.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
10. Orlikowska T., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, PWN, Warszawa, 219-248.
11. Malaure R. S., Barclay G., Rower R. W., (1991), *J. Plant Physiol.*, 139, 8-13.
12. Bhattacharya P., Dey S., Das N., Bhattacharya B. C., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 439-442.
13. Latkowska M., Chmiel H., (1996), *Zesz. Nauk. AR-T Bydgoszcz*, 197, 129-136.