



Zastosowanie kultur *in vitro* i inżynierii genetycznej w hodowli róż

Teresa Orlikowska, Iwona Wach, Danuta Kucharska
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

Roses breeding: *in vitro* culture and genetic engineering

Summary

Prerequisites for successful transformation are developed protocols on efficient regeneration of adventitious shoots or somatic embryos. The most important works concerning regeneration, the objectives and achievements in rose transformation are discussed.

Key words:

rose, transformation, regeneration, shoot, embryo.

1. Wstęp

Róża jest najbardziej popularną rośliną ozdobną. Wzrastający z każdym rokiem popyt na kwiaty stymuluje intensywną hodowlę nowych odmian. Pomimo że opisano ponad 240 gatunków róż, to współcześnie uprawiane odmiany pochodzą z przekrzyżowania zaledwie od dziesięciu do dwudziestu gatunków (4). Prowadzona od stuleci selekcja ukierunkowana na bardzo podobne cechy, spowodowała znaczne zawężenie puli genetycznej. Współczesne odmiany mają bardzo wysoką wartość dekoracyjną i wysoką produktywność, ale równocześnie są podatne na prawie wszystkie choroby i szkodniki róż, co powoduje konieczność wielokrotnego stosowania pestycydów, zarówno w nasadzeniach ogrodowych i rabatowych, jak i w czasie produkcji kwiatów. Zaawansowanie metod biotechnologicznych spowodowało, że także hodowcy róż widzą w transformacji genetycznej sposób na wprowadzanie pojedynczych genów użytkowych, bez

Adres do korespondencji

Teresa Orlikowska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

4 (51) 40-47 2000

rozchwiania genotypów. Największe zainteresowanie budzą geny podwyższające odporność na choroby i szkodniki oraz stropy powodowane czynnikami środowiska w czasie uprawy, transportu i sprzedaży, a także modyfikujące kolor i zapach (3,4,10,29,31,34,35). Warunkiem wstępnym do uzyskania roślin transgenicznych jest znajomość sposobu wydajnej regeneracji pędów przybyszowych lub zarodków somatycznych z pojedynczych komórek.

2. Organogeneza

Hill (12) pierwszy doniósł o wytworzeniu pędów przybyszowych na kalusie otrzymanym z merystemu wierzchołkowego pędu. Istnieją jednak wątpliwości co do przybyszowego charakteru tych pędów (17), gdyż mogły wyrosnąć z merystemów bocznych, wprowadzonych do kultur z wierzchołkiem wzrostu, który tylko obrócił kalusem. W celu wyeliminowania takiej możliwości, należy indukować regenerację z blaszek lub ogonków liściowych, korzeni oraz międzywęzłowych segmentów łodyg.

Pędy przybyszowe mogą powstawać bezpośrednio na eksplantatach tkankowych lub z wytworzonego na nich kalusa. Do celów otrzymywania roślin transgenicznych, bardziej przydatna, jak się wydaje, jest regeneracja z kalusa, ponieważ na ogół pędy zregenerowane w sposób bezpośredni po kokultywacji nie są transgeniczne, ale mogą być chimerami. Pierwsze oznaki bezpośredniej regeneracji, to widoczne po dziesięciu, czternastu dniach małe, zielone, zaczątki pędów na górnej powierzchni proksymalnej części blaszki, na skrzyżowaniu głównych nerwów i nasadzie ogonka liściowego. Różnicowanie pędów następuje w wyniku podziałów komórek warstwy subepidermalnej lub z mezofilu, w miejscach przyległych bezpośrednio do wiązek przewodzących (6). Regeneracja zależy w dużym stopniu od typu eksplantatu. W doświadczeniach Lloyd i wsp. (17) bezpośrednia regeneracja z liści była możliwa u trzech genotypów (*R. persica* x *xanthina*, *R. laevigata*, *R. wichuraiana*), natomiast regenerację z korzeni i z kalusa otrzymanego z fragmentów pędu uzyskano tylko u *R. persica* x *xanthina*. W tym przypadku pędy wyrastały z perycykla korzeni oraz z punktów merystemowych na powierzchni kalusa lub bezpośrednio pod jego powierzchnią. Dubois i de Vries (6) badali zdolność do bezpośredniej regeneracji różnych części czterech najmłodszych 5-listkowych liści, pobranych z roślin uprawianych w szklarni. Najwyższą wydajność regeneracji ocenianej po 30 dniach kultury wykazały dolne części listków wraz z ogoneczkami oraz ogonek liściowy z przylistkami. W naszych doświadczeniach prowadzonych wg metody Dubois i de Vries (6) wynik regeneracji był uzależniony od pory roku, a nawet przebiegu pogody (nasłonecznienia) w okresie pobierania ze szklarni eksplantatów do regeneracji. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym w tej metodzie jest konieczność odkażania powierzchniowego eksplantatów przed zainicjowaniem regeneracji i nieuniknione, tak jak we wszystkich kulturach inicjalnych, ujawnianie się zakażeń wniesionych z zewnątrz. Prowadziliśmy zatem regenerację z najmłodszych liści, pobranych z pędów

namnażających się *in vitro*. Na przebieg regeneracji korzystnie wpływała etiolacja kultur w 4°C (25) oraz kondycjonowanie kultur matecznych przez dwa i cztery tygodnie na pożywce z tidiazuronem (36).

Stosowane pożywki do regeneracji bezpośredniej lub pośredniej, zawierały sole mineralne i witaminy Murashige i Skooga – MS (23), sacharozę i agar oraz cytokininę i auksynę, ale rodzaj, stężenie i wzajemne proporcje tych regulatorów wzrostu były zależne od innych czynników chemicznych i fizycznych, a przede wszystkim od genotypu (tab. 1). Przełomowe dla wydajności i rozszerzenia liczby regenerujących genotypów było zastosowanie tidiazuronu (TDZ) do zaindukowania regeneracji (6,13,27).

Tabela 1

Warunki stosowane do regeneracji pędów przybyszowych róż

Genotyp	Eksplantat początkowy	Regulatory wzrostu (mg/l)	Reakcja	Czynnik najważniejszy lub usprawniający	Literatura
1	2	3	4	5	6
<i>Rosa hybrida</i> „The Doctor”	merystem wierzchołkowy	K 0,2, NAA, 2 K 1	kalus, zaczątki pędów	zmiana regulatorów w kolejnych pożywkach (?)	12
<i>R. hybrida</i> „White Dream” „Darling” „Goldy”	odcinki węzłowe bez merystemów	BA 1-2, GA ₃ 1-2, BA 5, IBA 0-0,1, GA ₃ 0,1-2	kalus pędy	wysokie stężenie BA, genotyp, składniki mineralne	32
<i>R. persica x xanthina</i>	międzywęźla	BA 1-2, NAA 0,1-0,3	kalus pędy bezpośrednie pędy	stężenie BA, genotyp, eksplantat	17
<i>R. laevigata</i> , <i>R. persica x xanthina</i> <i>R. wichuraiana</i> <i>R. wichurata</i>	liście	BA 3, NAA 0,1-0,3 BA 0,5	bezpośrednie pędy		
	korzenie	BA 2	bezpośrednie pędy		
<i>R. damascena</i>	międzywęźla	NAA 1,9, BA 2,3, IAA 0,2	kalus pędy	NH ₄ NO ₃ , dodatek jonoforu wapnia	14
<i>R. hybrida</i> „Meirutral”	liście, korzenie liście, przylistki, płatki, działki, pylniki, międzywęźla	BA 1-2,6, NAA 0,005-0,2	bezpośrednie pędy kalus pędy	rodzaj eksplantatu	1
<i>R. hybrida</i> „Madelon” „Only love” „Presto”, „Sonia” „Tineke”	liście, ogonki	TDZ 1,5, NAA 0,5 BA 0,5, NAA 0,01	indukcja bezpośrednie pędy	rodzaj eksplantatu, genotyp, dodatek AgNO ₃	6

1	2	3	4	5	6
<i>R. hybrida</i> „Carefree Beauty” <i>R. chinensis</i> <i>minima</i> „Red Sunblaze” „Baby Katie”	liście, międzywę- źła	NAA 2, TDZ 5, GA ₃ 1,1	kalus pędy	glukoza, genotyp, rodzaj eksplantatu	13
<i>R. hybrida</i> „Compassion” „Florentina” „White Gem”	liście	jak Dubois i de Vries	bezpośrednie pędy	kultury mateczne na pożywce z dodatkiem TDZ	36

BA – benzyloaminopuryna, K – kinetyna, TDZ – tidiazuron, IAA – kwas indolilo-3-octowy, NAA – kwas naftylo-1-octowy, IBA – kwas indolilo-3-masłowy, GA₃ – kwas giberelowy.

Niezbędne do regeneracji auksyny i cytokininy stymulują biosyntezę etylenu w tkankach (2). W kulturach róż *in vitro* etylen hamuje wytwarzanie pędów przybyszowych i przyspiesza starzenie się kultur. Dubois i de Vries (6) wykazali, że na pożywce zawierającej 10 mg/l AgNO₃ pędy przybyszowe pojawiały się wcześniej, a ogólna wydajność regeneracji była wyższa o 29%. Ishioka i Tanimoto (14) wskazali na pozytywny wpływ jonoforu wapnia na regenerację pędów z kalusa utworzonego na międzywęźlach *R. damascena*. Bezpośrednia regeneracja pędów przybyszowych pozwala na uzyskanie roślin w czasie od czterech do sześciu tygodni, a regeneracja z zarodków somatycznych następuje w czasie od czterech do osiemnastu miesięcy (15,24,28) i powoduje mniejsze zagrożenie pojawieniem się mutacji somaklonalnych, ponieważ nie występuje tu etap indukcji na pożywkach z wysokim stężeniem auksyny. Krytycznym czynnikiem są właściwości genotypu. Wśród 24 badanych odmian procent eksplantatów regenerujących pędy przybyszowe wynosił od 65 do 100, a liczba pędów z eksplantatu od 0,5 do 4 (7).

3. Regeneracja zarodków somatycznych

Somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* może zachodzić bezpośrednio na eksplantatach tkankowych lub częścię na kalusie lub w zawiesinach komórkowych. Do wytworzenia embriogenego kalusa najczęściej stosowano auksyny syntetyczne 2,4-D, pCPA, NAA i NOA, w stężeniach od 0,05 do 11 mg/l (tab. 2). Różnicowanie zarodków prowadzono zazwyczaj na pożywkach takich samych jak indukcyjne, o zmniejszonym stężeniu auksyn (0,022-3 mg/l) lub bez dodatku auksyn. Dojrzewanie zarodków, czyli formowanie merystemu pędowego i korzeniowego odbywało się najczęściej na pożywce z dodatkiem BA i GA₃ i/lub ABA. Kielkowanie całkowicie ukształtowanych zarodków może być stymulowane obecnością gibereliny. Na indukcję embriogenezy somatycznej róży mają wpływ, poza genotypem, takie czynni-

ki, jak pochodzenie eksplantatu, skład pożywki, a także intensywność oświetlenia (5,15,18,22,24,33).

Tabela 2

Warunki stosowane do regeneracji zarodków somatycznych róż

Genotyp	Eksplantat inicjalny	Pożywka/regulatory wzrostu i prolina w mg/l sacharoza i maltoza w g/l			Literatura
		indukcja kalusa embriogenego	różnicowanie zarodków	dojrzwianie i kiełkowanie	
<i>R. hybrida</i> „Domingo” „Wickey Brown”	blaszki liściowe	0,5 × MS, sacharoza 20, K 0,1, NAA 0,05 lub K 0,1, NOA 0,1	jak indukcja	MS, sacharoza 30, BA 2, IAA 1	5
<i>R. hybrida</i> „Royalty”	nitki pylnikowe	B-5 (9) zmodyfikowane, witaminy KM, gelrite 2,4-D 2, Z 1,5	MS, gelrite, NAA 0,25, Z 1,5, GA ₃ 1	MS, sacharoza 20, gelrite, GA ₃ 1, ABA 0,2-2	24
<i>R. hybrida</i> „Sonia”, „Presto”, „Landora”, „Melody”, „Tineke”, „White Weekend”	korzenie przybyszowe	SH (30), witaminy, kwasy organiczne i cukry KM, gelrite, 2,4-D 11	bez 2,4 D	MS, sacharoza, agar BA 0,5, NAA 0,01	3
<i>R. hybrida</i> „Trumpeter” „Glad Tidings”	płatki kwiatowe korzenie	SH, sacharoza 30, agaroza, 2,4-D 5, prolina 300	SH, sacharoza 30, agaroza, 2,4-D 3, prolina 300	S-H, agaroza dojrzwianie: sacharoza 30, chlód, 2,4-D 1, ABA 1, GA ₃ 0,3 kiełkowanie: maltoza 30, BA 1, IBA 0,1	18
<i>R. hybrida</i> „Arizona”	płatki kwiatowe	M-S, dicamba 1	MS, 2,4-D 0,022, 2iP 2,45	0,5 × M-S dojrzwianie: ABA 0,25 kiełkowanie: NAA 0,5, PG 100	22
<i>R. hybrida</i> „Moneyway”	korzenie	SH, gelrite, 2,4-D 11	SH, gelrite	SH, gelrite	33
<i>R. hybrida</i> „Soraya”	liście ze szklarni	MS, sacharoza 30, pCPA 10, K 1	jak indukcja	MS, intensywne światło, BA 1,2, IAA 1	15

MS – pożywka wg Murashige i Skooga (23), SH – pożywka wg Shenk i Hildebrandt (30), B-5 – pożywka wg Gamborg i Miller (9), BA – benzyloaminopuryna, K – kinetyna, 2iP – 6(γ, γ-dimetyloaliloamino)-puryna, Z – zeatyna, IAA – kwas indolilo-3-octowy, NAA – kwas naftylo-1-octowy, NOA – kwas 2-naftoksyoctowy, 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, pCPA – kwas p-chlorofenoksyoctowy, ABA – kwas abscysynowy, GA₃ – kwas gibberelowy, PG – floriglucyna.

Zarodki somatyczne otrzymywano z kalusa pochodzącego z liści (5,13,15,28), nitek pręcikowych (24), niedojrzałych nasion (16), korzeni przybyszowych (33), ogonków liściowych i korzeni (18) oraz płatków kwiatowych (22). Zdolność róż do regeneracji drogą embriogenezy somatycznej jest w dużym stopniu uzależniona od genotypu. Z naszych obserwacji wynika, że genotypy o małym potencjale do regeneracji pędów przybyszowych mają większą skłonność do regeneracji zarodków (dane nie publikowane).

Noriega i Sondahl (24) donieśli o możliwości utrzymania potencjału embriogenego kalusa przez 18 miesięcy. Kalus taki nie tracił zdolności embriogennej po przechowywaniu w ciekłym azocie przez 24 miesiące (8). Kalus z długoterminową zdolnością do tworzenia zarodków somatycznych otrzymali również Hsia i Korban (13) oraz Marchant i wsp. (18). Gelrite i dodatek substancji organicznych zwiększał wydajność regeneracji (33). L-prolina (300 mg/l) stosowana we wczesnych stadiach embriogenezy wzmagala tworzenie zarodków somatycznych, a w późniejszych stadiach kultury zwiększała częstotliwość występowania anormalnych zarodków (18). Wydajność kiełkowania zarodków może zwiększać zastosowanie BAP i chłodu. Indukcja i różnicowanie zarodków prowadzone są zazwyczaj w ciemności lub na świetle o niskiej intensywności. Wysoka intensywność światła jest natomiast istotna dla dojrzwania i kiełkowania zarodków (8,13,15,16,24,28).

Zdolność róż do regeneracji przez embriogenezę somatyczną jest zależna od genotypu i ograniczona tylko do pewnych odmian, okres regeneracji jest długi, wydajność niska, a stosowanie wysokich stężeń auksyny do indukcji embriogenego kalusa powoduje nagromadzenie w kulturze mutacji spontanicznych, prowadzących do wytworzenia nienormalnych zarodków i roślin o fenotypie odmiennym jak u form wyjściowych (1,11).

4. Transformacja

Nad transformacją róży pracuje się w kilku ośrodkach naukowych, przedsiębiorstwach hodowlanych i biotechnologicznych. Do tej pory nie ma jednak odmiany transgenicznej, chociaż są doniesienia o wprowadzeniu genów użytkowych. Derks i wsp. (3) otrzymali zarodki somatyczne odmiany „Sonia” transformowane genem cekropiny B. Celem tej pracy było wprowadzenie odporności na bakterie „wazonowe” i przedłużenie trwałości kwiatów po ścięciu. Souq i wsp. (31) transformowali odmianę M. Delbard przez kokułtywację embriogenego kalusa z *A. tumefaciens*, zawierającą gen *rol C* lub gen syntazy chalconu w formie antysensu. W pierwszym przypadku otrzymano rośliny karłowate, z małymi nieplodnymi kwiatami o intensywnym kolorze płatków, zredukowanym systemie korzeniowym i zwiększonej zdolności do krzewienia. Rośliny z genami antysensu CHS miały jaśniejszą barwę kwiatów. Van der Salm i wsp. (34) transformowali podkładkę róży „Moneyway” genami *rol A*, *B* i *C*, przez kokułtywację odcinków pędów z *A. rhizogenes* i indukcję kalusa

embriogenego z odpornych korzeni. Uzyskano rośliny o zahamowanej dominacji wierzchołkowej, skróconych pędach i bardzo wysokiej zdolności do ukorzeniania. Marchant i wsp. (19) do komórek kalusa embriogenego odmiany „Glad Tidings”, wrażliwej na czarną plamistość, wprowadzili metodą biolistyczną gen chitynazy klasy I, wyizolowany z ryżu. Rośliny transgeniczne były w mniejszym stopniu porażone grzybem. Stopień zwiększenia odporności był skorelowany z poziomem chitynazy.

Problemem pojawiającym się po kokultywacji z *A. tumefaciens* jest wyeliminowanie bakterii z eksplantatów roślinnych. Wykazaliśmy, że azotan srebra, który sprzyja regeneracji pędów przybyszowych, może być także wykorzystany jako czynnik bakteriobójczy po kokultywacji (25), jeśli pożywka nie zawiera organicznych form azotu i może zastąpić karbenicylinę i cefotaksym, przynajmniej podczas pierwszego pasażu po kokultywacji z bakteriami.

5. Wnioski

Wszystkie transgeniczne rośliny róż (3,8,19-21,31,34) otrzymano z embriogenego kalusa. Można zatem wnioskować, że tylko w systemie kultury zdolnej do długotrwałej regeneracji pędów przybyszowych lub zarodków somatycznych jest możliwe wyselekcjonowanie komórek transformowanych, a z nich roślin transgenicznych.

Literatura

1. Arene L., Pellegrino C., Gudin S., (1993), *Euphytica*, 71, 83-90.
2. Biddington N. L., (1992), *Plant Growth Regulation*, 11, 173-187.
3. Derks F. H. M., van Dijk A. J., Hänisch ten Cate C. H., Florack D. E. A., Dubois L. A. M., de Vries D. P., (1995), *Acta Horticulturae*, 405, 205-209.
4. de Vries D. P., Dubois L. A. M., (1996), *Acta Horticulturae*, 424, 241-248.
5. de Wit J. C., Esendam H. F., Honkanen J. J., Tuominen U., (1990), *Plant Cell Reports*, 9, 456-458.
6. Dubois L. A. M., de Vries D. P., (1995), *Gartenbauwissenschaft*, 60, 249-253.
7. Dubois L. A. M., de Vries D. P., Koot A., (1997), *Acta Horticulturae*, 447, 79-85.
8. Firoozabady E., Moy Y., Courtney-Gutterson N., Robinson K., (1994), *Bio/technology*, 12, 609-613.
9. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojuna K., (1968), *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
10. Gudin S., (1995), *Acta Horticulturae*, 420, 125-128.
11. Gudin S., Mouchotte J., (1996), *Acta Horticulturae*, 424, 285-291.
12. Hill G. P., (1967), *Nature*, 216, 596-597.
13. Hsia C., Korban S. S., (1996), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 1-6.
14. Ishioka N., Tanimoto S., (1990), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 22, 197-199.
15. Kintzios S., Manos C., Makri O., (1999), *Plant Cell Reports*, 18, 467-472.
16. Kunitake H., Imamizo H., Mii M., (1993), *Plant Science*, 90, 187-194.
17. Lloyd D., Roberts A. V., Short K. C., (1988), *Euphytica*, 37, 31-36.
18. Marchant R., Davey M. R., Lucas J. A., Power J. B., (1996), *Plant Science*, 120, 95-105.
19. Marchant R., Davey M. R., Lucas J. A., Lamb C. J., Dixon R. A., Power J. B., (1998), *Molecular Breeding*, 4, 187-194.

20. Marchant R., Power J. B., Lucas J. A., Davey M. R., (1998), *Annals of Botany*, 81, 109-114.
21. Matsuda Y., Toyoda H., Nakahara T., Ogata Y., Ouchi S., (1996), *Plant Breeding Abstracts*, 66 (10), 1499.
22. Murali S., Sreedhar D., Lokeswari T. S., (1996), *Euphytica*, 91, 271-275.
23. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
24. Noriega C., Sondahl M. R., (1991), *Bio/technology*, 9, 991-993.
25. Orlikowska T., Kucharska D., Nowak E., Rojek Ż., (1996), *Genet. Pol.*, 37A, 122-125.
26. Orlikowska T., Marasek A., (1999), COST 822 Meeting, Kraków, 19.
27. Rosu A., Skirvin R. M., Bein A., Norton M. A., Kushad M., Otterbacher A. G., (1995), *J. Hort. Sci.*, 70, 901-907.
28. Rout G. R., Debata B. K., Das P., (1991), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 65-69.
29. Rout G. R., Samantaray S., Mottley J., Das P., (1999), *Scientia Hortic.*, 81, 201-228.
30. Schenk R. U., Hildebrandt A. C., (1972), *Can. J. Bot.*, 50, 199-204.
31. Souq F., Coutos-Thevenot P., Yean H., Delbard G., Maziere Y., Barbe J., Boulay M., (1997), *Acta Horticulturae*, 424, 381-388.
32. Valles M., Boxus P., (1987), *Acta Horticulturae*, 212, 691-696.
33. van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., Hänisch ten Cate C. H., Dons H. J. M., (1996), *Plant Cell Reports*, 15, 522-525.
34. van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., Bouwer R., Hänisch ten Cate C. H., Dons H. J. M., (1997), *Molecular Breeding*, 3, 39-47.
35. Walker S., (1997), *Acta Horticulturae*, 424, 389-391.
36. Wach I., Kucharska D., Orlikowska T., (2000), *Streszczenia IX Ogólnopolskiej Konferencji Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin, „Modyfikowanie genomu roślinnego”*, Gdańsk, 149.