



## Ocena polskich odmian koniczyny czerwonej pod względem zdolności do somatycznej embriogenezy

Romuald Doliński

Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, Lublin

### Screening of Polish red clover cultivars for their capability to somatic embryogenesis

#### Summary

Ten Polish red clover cultivars were tested *in vitro* for their capability to produce callus and somatic embryos. A three-step tissue culture protocol (callus induction, embryo induction and plant development) based on Gamborg's B<sub>5</sub> basal salts, NAA and 2,4-D as auxins, and kinetin and adenine as cytokinins was utilized. Explants source were petiole and hypocotyl sections. All clover varieties under study have showed high efficiency of callus production, and low ability for plant regeneration from the callus. The highest percent of genotypes which developed embryos was observed on variety Parka (3,6). Single embryogenic genotypes were selected from nearly all varieties. Hypocotyls showed the greatest ability for callus regeneration comparing to leaf petioles.

#### Key words:

red clover, somatic embryogenesis, plant regeneration.

### 1. Wstęp

Koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.) należy do roślin uprawnych o powolnym postępie hodowlanym. Nadzieje na przyspieszenie prac hodowlanych prowadzonych na tej roślinie pojawiły się po wprowadzeniu do praktyki metod biotechnologicznych. Pozwalają one na zwiększenie zmienności genetycznej przez wytwarzanie mieszańców oddalonych trudnych lub wręcz niemożliwych do otrzymania metodami tradycyjnymi, celowe generowanie zmienności somaklonalnej, wytwarzanie odmian

#### Adres do korespondencji

Romuald Doliński,  
Instytut Genetyki  
i Hodowli Roślin,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Akademicka 15,  
20-934 Lublin.

---

**biotechnologia**

2 (65) 123-130 2004

transgenicznych. Umożliwiają prowadzenie selekcji w kulturach *in vitro* zamiast na polu, czy szybkie namnażanie komponentów odmian mieszańcowych.

Do podstawowych technik wykorzystywanych przy wielu pracach prowadzonych w laboratoriach kultur *in vitro* należy mikrorozmnażanie przez somatyczną embriogenezę. Podręczniki biotechnologii zaliczają koniczynę czerwoną do gatunków trudno rozmnażających się przez somatyczną embriogenezę (1,2). O słuszności tego poglądu świadczy mała liczba opublikowanych prac, opisujących udaną somatyczną embriogenezę u tego gatunku. Podobnie jak u wielu innych roślin u *Trifolium pratense* zdolność do wytwarzania kalusa i somatycznej embriogenezy jest uwarunkowana genetycznie (3-5), dlatego pierwszym etapem prac możliwych do przeprowadzenia w kulturach *in vitro* musi być selekcja (wytworzenie) embriogennych genotypów.

Celem przedstawianych badań było porównanie polskich odmian koniczyny czerwonej pod względem zdolności do somatycznej embriogenezy oraz ewentualna selekcja embriogennych genotypów.

## 2. Materiał i metodyka badań

Przedmiotem badań było 10 polskich odmian koniczyny czerwonej, 8 diploidalnych (Bryza, Dajana, Krynia, Nike, Parada, Parka, Raba i Rozeta) i 2 tetraploidalne (Bona i Jubilatka). W badaniach wykorzystano metodykę opracowaną przez Quesenberry i Smith (5). Nasiona odkażano przez 10 minut za pomocą 0,2% roztworu  $HgCl_2$  z dodatkiem kilku kropli płynu do zmiękczenia tkanin, płukano w sterylnej wodzie (3 x 10 min), a następnie wysiewano do słoików 0,5 l na zestaloną agarę (0,8%) pożywkę podstawową  $B_5$  (6). Po trzech tygodniach ze sterylnych roślin odcinano fragmenty hipokotyli i ogonków liściowych o długości 2-3 mm, które wykładano do szalek Petriego na pożywkę indukcyjną. W każdej szalce umieszczano po 5 eksplantatów z hipokotyli i ogonków liściowych pochodzących z jednej rośliny. Zamknięte parafilmem szalki układano na półkach pokoju hodowlanego (temp. 25°C, światło białe, fotoperiod 16/8). Eksplantaty każdej odmiany wyłożono na 3 x 45 szalkach. Kalus indukowano za pomocą pożywki  $B_5$  uzupełnionej przez dodanie: 100 mg/l mioinozytolu, 2,25 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA i 2,12 mg/l kinetyny. Po 4 tygodniach inkubacji oceniono rozmiary kalusów w skali 9-stopniowej, opracowanej na podstawie badań wstępnych. Ocenę wykonano osobno dla kalusów z hipokotyli i ogonków liściowych na 3 x 30 genotypach każdej odmiany. Po ocenie wszystkie kalusy przekładano na pożywkę przeznaczoną do indukcji embriogenezy. Była to pożywka  $B_5$  wzbogacona przez dodanie: 100 mg/l mioinozytolu, 2 mg/l NAA, 2 mg/l adeniny i zwiększonej zawartości tiaminy (20 mg/l). Po 14 i 28 dniach hodowli przeanalizowano wszystkie kalusy w 25-krotnym powiększeniu binokularu, policzono zarodki somatyczne w stadium torpedy i starsze. Na koniec tego etapu powtórzono ocenę kalusów, opisano zmiany w ich zabarwieniu i policzono kalusy, na których zaczęły rozwijać się korzenie. Wszystkie kalusy przełożono na pożywkę  $B_5$  zawierającą



100 mg/l mioinozytolu, 20 mg/l tiaminy oraz 0,2 mg/l NAA w celu wywołania rozwoju pędów. Po 28 dniach oceniono znowu rozmiary kalusów, opisano ich zabarwienie i policzono kalusy z korzeniami. Rozwijające się pędy i zaawansowane w rozwoju zarodki somatyczne przeniesiono na pożywkę B<sub>5</sub> bez hormonów w celu przyspieszenia rozwoju korzeni. Ukorzenione rośliny wysadzono do doniczek z ziemią ogrodniczą i poddano hartowaniu. Wyniki obserwacji opracowano statystycznie. Na podstawie średnich ocen wielkości kalusów poszczególnych roślin obliczono współczynniki zmienności wewnątrzodmianowej. Istotność różnic pomiędzy rozmiarami kalusów obliczono metodą podziałów ufności Tukeya.

### 3. Wyniki i dyskusja

W badanych odmianach koniczyny czerwonej wykazano dużą zdolność do indukcji kalusa. W żadnej z nich nie znaleziono genotypów nie wytwarzających tej tkanki. Stwierdzono dużą zmienność wewnątrzodmianową. Rozwój kalusa rozpoczynał się najczęściej po dwóch tygodniach indukcji, ale część genotypów indukowała się później. U niektórych genotypów część eksplantatów zmieniała zabarwienie na ciemnobrązowe i zamierała nie wytwarzając kalusa. Procentowy udział tych eksplantatów zależał od odmiany i rodzaju eksplantatu (tab. 1). U wszystkich odmian zamierały częściej eksplantaty z ogonków liściowych (0,83-4,83%) niż z hipokotyli (0,33-3,50%). Po 28 dniach indukcji stwierdzono istotne różnice międzyodmianowe pod względem średnich rozmiarów kalusów. U wszystkich odmian kalusy otrzymane z odcinków hipokotyli były istotnie większe od kalusów z ogonków liściowych. Różnice te zanikły pod koniec etapu indukcji embriogenezy. Współczynniki zmienności wewnątrzodmianowej były po pierwszym etapie badań większe dla kalusów z ogonków liściowych (23,3-29,9%) niż dla kalusów z hipokotyli (12,7-19,4%). Potem utrzymywały się na zbliżonym poziomie (tab. 1).

Tabela 1

Średnie rozmiary kalusów (skala 1-9) po kolejnych etapach doświadczenia oraz procentowy udział eksplantatów nie wytwarzających kalusa

Odmiana	Średnia wielkość kalusów						Udział eksplantatów nie wytwarzających kalusa (%)		
	po etapie indukcji kalusa		po etapie indukcji embriogenezy		po regeneracji pędów		H	O	
	H	O	H	O	H	O			
I	2	3	4	5	6	7	8	9	
Bona	x	4,15	3,10	6,87	6,84	7,96	8,05	0,83	2,00
	W	13,7	23,0	10,5	11,7	9,7	10,9		
Bryza	x	4,11	3,09	6,91	6,97	7,77	8,26	1,33	2,83
	W	16,0	25,1	10,3	10,0	6,4	7,3		

1		2	3	4	5	6	7	8	9
Dajana	x	4,16	2,79	7,02	7,11	7,79	8,28	2,00	3,83
	W	12,7	28,4	7,9	9,7	10,1	9,0		
Jubilatka	x	4,27	3,62	6,96	6,85	8,00	8,31	3,50	4,17
	W	13,7	24,0	9,9	9,2	9,5	10,5		
Krynica	x	4,05	2,85	7,12	6,90	8,03	8,24	3,00	4,83
	W	18,3	24,6	10,4	11,1	8,0	9,0		
Nike	x	4,03	3,10	6,99	6,90	8,26	8,31	0,66	1,17
	W	16,4	28,6	8,8	11,8	7,1	8,8		
Parada	x	4,12	3,01	7,06	7,11	7,96	8,45	1,50	2,50
	W	15,8	27,0	7,3	8,7	9,7	8,2		
Parka	x	4,20	3,31	7,11	7,17	7,83	8,28	1,33	1,67
	W	13,5	25,6	8,6	8,0	11,2	8,1		
Raba	x	4,13	3,61	7,00	7,00	7,96	8,20	0,33	0,83
	W	14,0	21,9	8,8	9,5	11,3	10,5		
Rozeta	x	4,07	2,99	7,09	7,06	8,01	7,96	1,83	3,81
	W	19,4	29,9	8,7	11,3	8,2	9,5		
Średnia ogólna		4,13	3,15	7,01	6,99	7,96	8,23	1,63	2,76
NIR przy p = 0,05		0,23	0,28	ns	ns	ns	0,23	-	-
		0,26		ns		0,28		-	

H – kalusy z odcinków hipokotyli, O – kalusy z ogonków liściowych, x – średnia dla odmian, W – współczynnik zmienności wewnątrzodmianowej (%)

Różnice w zdolności odmian i pojedynczych roślin koniczyny czerwonej do wytwarzania kalusa były obserwowane w wielu badaniach. Wyniki są trudne do porównania w związku z wykorzystywaniem różnych odmian i różnej metodyki badań. Broda (3) stwierdził słabą zdolność koniczyny czerwonej do wytwarzania kalusa. W jego badaniach dwie populacje tetraploidalne nie wytwarzały kalusa z hipokotyli, a w dziewięciu populacjach diploidalnych udział roślin wytwarzających kalus był niski (0-3%). Philips i Collins (7) wykazali, że podatność na indukcję kalusa i szybkość rozwoju tej tkanki zależą od stosowanej metodyki badań. W ich badaniach zdolność pięciu odmian koniczyny do tworzenia kalusa była słaba w doświadczeniu wstępnym, wzrosła znacznie po użyciu najlepszej ze 125 kombinacji pożywek. Keyes i in. (4) wykazali, że u koniczyny czerwonej można szybko poprawić zdolność do wytwarzania kalusa. W ich badaniach masa kalusa oceniana po 35 dniach wzrostu była cechą wysoko odziedziczną (54-69%), uwarunkowaną addytywnym działaniem genów.

Po 4 tygodniach indukcji wszystkie kalusy miały kolor jasnobrązowy (beżowy), były mocno uwodnione i miały zwartą strukturę. Zmiany w ich zabarwieniu i budowie morfologicznej rozpoczęły się po przeniesieniu na pożywkę przeznaczoną do indukcji embriogenezy (stosunek cytokiny do auksyny 1:1) i trwały do końca badań. Na koniec drugiego etapu badań wszystkie stały się mniej uwodnione, zmieniły strukturę na ziarnistą. Część kalusów zmieniła zabarwienie, niektóre zaczęły two-



rzyć korzenie, na niektórych znaleziono gładkie kuliste struktury (prazarodki). Zmiany zabarwienia zależały od odmian i genotypów (tab. 2), nie obserwowano różnic związanych z rodzajem eksplantatów. U wszystkich odmian koniczyny część kalusów zmieniała zabarwienie na ciemniejsze (11,7-25,9%), na niektórych pojawił się biały nalot (7,5-14,4%). Zmiany te dotyczyły tylko części roślin. Później w czasie regeneracji pędów wzrósł udział kalusów o ciemnym zabarwieniu, a zmalała liczba kalusów z białym nalotem (tab. 2). Na niektórych kalusach pojawiły się duże zielone segmenty (1,5-5,2%). U wszystkich odmian część kalusów wytwarzała korzenie, proces ten rozpoczął się na etapie indukcji embriogenezy i trwał na pożywce przeznaczonej do regeneracji pędów. Korzenie powstawały częściej na kalusach otrzymanych z ogonków liściowych niż na kalusach z hipokotyli. Pod koniec etapu regeneracji pędów na większości ciemno zabarwionych kalusów obserwowano objawy zamierania w postaci ciemnobrązowych lub czarnych plam (skupisk martwych komórek).

Tabela 2

## Zmiany niektórych właściwości kalusów na etapach indukcji embriogenezy i regeneracji pędów

Odmiana		Ciemniejsze brązowe		Biały nalot na powierzchni		Zielone segmenty		Korzenie na kalusie z hipokotyli		Korzenie na kalusie z ogonków liściowych	
		K (%)	G (%)	K (%)	G (%)	K (%)	G (%)	K (%)	G (%)	K (%)	G (%)
Bona	1	14,7	28,2	10,2	32,7	–	–	0,4	6,6	8,7	26,2
	2	53,3	88,2	1,5	7,3	3,2	20,5	1,8	16,5	22,4	63,2
Bryza	1	13,8	31,8	14,4	24,3	–	–	2,6	12,1	9,8	27,6
	2	54,8	87,1	5,2	16,1	5,5	19,3	5,5	35,5	28,4	74,2
Dajana	1	20,7	35,9	15,2	17,5	–	–	1,8	12,3	10,1	27,8
	2	42,7	67,8	2,8	10,3	5,9	24,9	7,5	45,4	27,0	69,5
Jubilatka	1	18,2	43,2	9,1	26,4	–	–	0,9	8,2	6,3	22,8
	2	39,1	81,8	2,7	9,1	10,4	45,4	2,5	18,2	20,9	68,2
Krynica	1	11,7	33,3	11,4	38,1	–	–	1,4	4,7	7,4	21,4
	2	35,9	71,4	25,5	23,8	10,7	47,6	7,4	33,3	17,9	59,5
Nike	1	19,0	24,4	13,3	33,7	–	–	2,3	10,1	8,5	25,6
	2	36,8	55,1	3,8	14,5	12,9	38,3	9,4	42,0	24,1	70,0
Parada	1	20,7	35,2	13,3	40,7	–	–	2,8	13,6	8,3	24,8
	2	43,9	77,3	3,0	15,9	3,7	28,2	6,5	31,6	22,5	55,4
Parka	1	21,0	43,6	11,2	35,0	–	–	4,5	7,5	8,1	24,5
	2	47,6	75,7	4,6	14,8	13,9	34,1	7,2	36,3	20,6	63,6
Raba	1	16,1	32,9	7,5	20,9	–	–	1,5	8,4	4,8	10,7
	2	39,0	55,6	3,6	13,9	12,7	31,8	9,3	36,6	17,5	46,7
Rozeta	1	25,9	40,9	9,5	31,8	–	–	1,6	11,4	8,6	25,0
	2	63,3	85,7	4,3	9,5	6,7	28,6	10,0	47,6	30,5	76,2

K – kalusy, G – genotypy, 1 – po etapie indukcji embriogenezy, 2 – po etapie regeneracji pędów

U wszystkich roślin zabarwienie, uwodnienie i struktura kalusów zależą od genotypów i warunków doświadczalnych, a głównie składu pożywek i oświetlenia (1,2). W badaniach wykonanych przez Keyes i in. (4) zielone zabarwienie kalusa i wytwarzanie korzeni były u koniczyny czerwonej cechami wysokoodziedzicznymi uwarunkowanymi addytywnym działaniem genów. Obecność białego nalotu na kalusie okazała się cechą niskoodziedziczną, uwarunkowaną genami dominującymi.

Badane odmiany koniczyny czerwonej charakteryzowały się małą zdolnością do somatycznej embriogenezy (tab. 3). Największą częstotliwością embriogennych genotypów wykazała się odmiana Parka (3,6%), której nieznacznie ustępowały takie odmiany jak: Krynia (3,4%) i Nike (3,3%). Nie udało się znaleźć żadnego embriogennego genotypu w odmianie Bryza. Wyselekcjonowane genotypy różniły się pod względem efektywności somatycznej embriogenezy i zdolności do regeneracji pędów i roślin. Udział embriogennych kalusów wahał się od 10 do 60%. U większości roślin pierwsze zielone zarodki w stadium torpedy obserwowano pod koniec indukcji embriogenezy. Wcześniej na wielu kalusach obserwowano kuliste struktury, ale większość z nich zarastała kalusem lub przekształcała się w centra merystematyczne z których wyrastały korzenie. Genotypy różniły się pod względem liczby wytworzonych zarodków (5-51). W szerokich granicach wahała się intensywność somatycznej embriogenezy mierzona liczbą zarodków wytworzonych przez 1 embriogenny kalus (6,0-14,7) i liczbą zarodków przypadającą na 1 eksplantat (0,5-5,1). Na pożywkę ukorzeniającą przenoszono pędy i zaawansowane w rozwoju zarodki wraz z otaczającym je kalusem. Szybko ukorzeniły się pędy (niektóre wytwarzały korzenie już na pożywce regeneracyjnej). Starsze zarodki (w stadium torpedy i liścieniowym) rozwijały się na tej pożywce w pędy, a potem w rośliny, niektóre zarodki zamierały, ale pojawiały się też nowe. W całym doświadczeniu około 79% zarodków (liczonych na koniec etapu regeneracji pędów) przekształciło się w pędy i około 91% pędów wytworzyło korzenie.

Tabela 3

## Somatyczna embriogeneza, regeneracja i ukorzenianie pędów koniczyny

Odmiana	Liczba badanych roślin	Embriogenne genotypy (%)	Charakterystyka embriogennych genotypów						
			Udział embriogennych kalusów (%)	Liczba SZ w stadium torpedy i starszych		Intensywność embriogenezy		Liczba zregenerowanych pędów	Liczba otrzymanych roślin
				na etapie indukcji embriogenezy	na koniec regeneracji pędów	SZ z jednego embriogennego kalusa	SZ z jednego eksplantatu		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bona	112	0,9	10	6	14	14,0	1,4	11	11
Bryza	96	—	—	—	—	—	—	—	—



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dajana	107	2,8	40	12	31	7,8	3,1	27	27
			20	9	12	6,0	1,2	12	12
			20	–	16	8,0	1,6	9	4
Jubilatka	124	0,8	10	4	10	10,0	1,0	7	7
Krynica	118	3,4	30	14	23	7,7	2,3	22	21
			30	9	11	3,7	1,1	10	10
			20	4	17	8,5	1,1	12	12
			10	–	9	9,0	0,9	4	4
Nike	121	3,3	30	17	28	9,3	2,8	21	18
			30	8	21	7,0	2,1	20	20
			30	6	24	8,0	2,4	15	15
			10	1	5	5,0	0,5	2	1
Parada	98	2,0	40	6	33	8,3	3,3	32	26
			10	–	6	6,0	0,6	6	6
Parka	111	3,6	20	7	24	12,0	2,4	21	21
			20	4	29	14,5	2,9	23	20
			10	1	9	9,0	0,9	6	6
			10	–	11	11,0	1,1	11	7
Raba	115	0,9	30	9	13	4,3	1,3	14	11
Rozeta	92	2,2	60	24	51	8,5	5,1	32	30
			20	5	12	6,0	1,2	7	7

SZ – somatyczne zarodki

Niską zdolność koniczyny czerwonej do somatycznej embriogenezy i regeneracji roślin z kalusa obserwowano w wielu badaniach (3-5,8,9). Bhojwani i in. (8) otrzymali kalusy koniczyny czerwonej, nie obserwowali jednak somatycznej embriogenezy. Broda (3) obserwował u tej rośliny niską zdolność do regeneracji roślin z kalusa (u form diploidalnych procent roślin regenerujących z kalusa wynosił 0,56, a tetraploidalnych 1,0). Zdolność do somatycznej embriogenezy uwarunkowana jest u koniczyny czerwonej działaniem genów głównych i kumulatywnych (3-5). W badaniach Quesenberry i Smith (5) częstotliwość genotypów wytwarzających somatyczne zarodki i regenerujących rośliny wynosiła w populacji koniczyny czerwonej 4%, a po pięciu cyklach selekcji wzrosła do 72%. Odziedziczalność – w wąskim znaczeniu – wahała się w granicach 40-50%. Wysokie współczynniki odziedziczalności (0,25-54%) otrzymali również Keyes i in. (4). Broda (3) obserwował zjawisko epistazy. W jego badaniach o regeneracji roślin z kalusa decydowały geny hipostatyczne.

#### 4. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono spotykany w literaturze pogląd o małej zdolności *Trifolium pratense* do somatycznej embriogenezy i regeneracji roś-

lin z somatycznych zarodków. Naturalny potencjał embriogeny 10 polskich populacyjnych odmian koniczyny czerwonej był ogólnie niski. Częstość embriogeny genotypów była we wszystkich odmianach mała (0-3,6%). Wyselekcjonowane genotypy charakteryzowały się małą efektywnością somatycznej embriogenezy mierzoną procentowym udziałem embriogeny kalusów (10-60%) i średnią liczbą somatycznych zarodków przypadającą na 1 eksplantat (0,5-5,1). Poza tym dużo zarodków zamierało nie przekształcając się w pędy (około 21%), niektóre pędy zamierały nie wytwarzając korzeni (około 9%). Z badań innych autorów (5,4) wynika, że częstość embriogeny genotypów można w populacjach koniczyny czerwonej szybko zwiększyć przez powtarzającą się selekcję. Szybkiego postępu genetycznego można również oczekiwać przy selekcji zmierzającej do zwiększenia intensywności somatycznej embriogenezy i regeneracji roślin z somatycznych zarodków.

### Literatura

1. Zenkteler M., Bartkowiak E., Młodzianowski F., Zenkteler E., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, PWN, Warszawa.
2. Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., Przybecki Z., (1989), *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*, PWN, Warszawa.
3. Broda Z., (1984), *Roczniki AR w Poznaniu, Rozprawy Naukowe*, 140, 5-39.
4. Keyes G. J., Collins G. B., Taylor N. L., (1980), *Theor. Appl. Genet.*, 58, 265-271.
5. Quesenberry K. H., Smith R. R., (1993), *Crop Sci.*, 33, 585-589.
6. Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A., Vasil J. K., (1976), *In Vitro*, 12, 473-478.
7. Philips G. C., Collins G. B., (1979), *Crop Sci.*, 79, 59-64.
8. Bhojwani S. S., Mullins K., Cohen D., (1984), *Euphytica*, 33, 915-921.
9. Rybczyński J. J., (1991), *Regeneracja roślin w kulturach in vitro niektórych gatunków z rodziny Fabaceae*, Wyd. SGGW, Warszawa.