



## Wpływ cytokinin na morfogenezę buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) w kulturach *in vitro*

Maria Goška

Zakład Genetyki i Hodowli Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Bydgoszcz

### The effect of cytokinins on *in vitro* morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

#### Summary

The aim of the studies was to estimate the effect of cytokinins on the production of callus and shoots from different seedling explants of sugar beet. Two diploid multigerm genotypes were used in the experiment. The seedling explants (hypocotyls, cotyledons and leaves) were cultured on MS medium supplemented with cytokinins: BAP, 2iP, TDZ in concentrations 0,2; 1,0 and 2,0 mg/l.

Hypocotyls, cotyledons and leaves showed different abilities to form callus and shoots. After two weeks of culture, the induction of callus was mainly observed on the explants of hypocotyls and cotyledons, whereas adventitious shoots formed on leaf explants. Frequency of callus and shoots induction was dependent on the origin of the explants, concentration and type of the cytokinins. The highest percentage of regeneration was obtained on the explants of young leaves, on medium containing TDZ (51,5%). The optimal concentration of cytokinins was 1 mg/l. Plant regeneration on seedling explants came only under direct organogenesis.

#### Key words:

*Beta vulgaris* L., organogenesis, callus, shoots, plant regeneration.

#### Adres do korespondencji

Maria Goška,  
Zakład Genetyki i Hodowli  
Roślin,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
ul. Powstańców  
Wielkopolskich 10,  
85-090 Bydgoszcz;  
e-mail:  
m.goska@ihar.bydgoszcz.pl

### 1. Wstęp

Opracowanie metody pozwalającej na uzyskanie pożądanej liczby jednorodnych genetycznie roślin od wielu lat jest jednym z celów badań prowadzonych u buraka cukrowego. Rozmnażanie

wegetatywne w warunkach *in vivo*, jak się okazało, jest mało wydajne i wymaga stosunkowo dużych nakładów czasu i pracy (1,2). Znacznie większe możliwości rozmnażania roślin można uzyskać wykorzystując kultury *in vitro* (3,4).

W badaniach nad zdolnością do różnicowania różnych eksplantatów buraka w kulturach *in vitro* wykazano, że regeneracja roślin może zachodzić na drodze organogenezy bezpośredniej (5-7) lub pośredniej (8-11) oraz somatycznej embriogenezy (12-14). Jako źródło eksplantatów, służących do zainicjowania kultur *in vitro*, wykorzystywano korzenie, hipokotyle, liścienie i liście izolowane z młodych siewek (7,8,10,11,15) oraz ogonki liściowe pobrane z kultur pędowych (3,16,17). Stosowano liścienie wyizolowane z dojrzałych zarodków (14), a także cienkobarstwowe fragmenty blaszki liściowej (5). Jako eksplantaty służyły również pąki kwiatowe (2,18), pylniki (19), zalążki (20), segmenty apikalne i subapikalne kwiatostanów (18,21,22) oraz wierzchołki wzrostu siewek (23,24) i pędów kwiatostanowych (18,25). Podjęto także badania, w których wykorzystano jako materiał wyjściowy protoplasty wyizolowane z ogonków i blaszek liściowych (26,27).

Na podstawie wyników badań procesu regeneracji wskazuje się, że zdolność do odpowiedzi morfogenetycznej zależy od wielu czynników, m.in. od wieku i rodzaju eksplantatu, genotypu, składu pożywki oraz warunków kultury (7,8,11). Celem podjętych badań było określenie wpływu różnych cytokinin na tworzenie kalusa i regenerację roślin z eksplantatów siewek dwóch genotypów buraka cukrowego. Wydajna metoda regeneracji buraka w kulturach *in vitro* ma zasadnicze znaczenie dla uzyskania dużej liczby jednorodnych regenerantów przydatnych w hodowli i genetycznej transformacji.

## 2. Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiły dwa diploidalne wielonasienne zapylacze buraka cukrowego: R58 i DL3. Nasiona buraka (kłębki) po zaprawieniu środkiem grzybobójczym (Tachigaren 70 WP) wysiano do kuwet z wysterylizowaną glebą. 21-dniowe siewki pozbawione korzonków sterylizowano powierzchniowo w 3% roztworze podchlorynu wapnia przez 20 min. Po trzykrotnym płukaniu w bidestylowanej, sterylnej wodzie izolowano trzy rodzaje eksplantatów.

Z każdej siewki pozyskiwano po dwa 7 mm odcinki hipokotyli oraz cztery z liścieni (po dwa z każdego liścienia). Eksplantaty liści ze względu na niewielkie ich rozmiary wykładano na pożywkę w całości. W doświadczeniach stosowano pożywkę mineralną Murashige i Skooga (28) z dodatkiem związków organicznych: sacharozy (30 g/l), inozytolu (100 mg/l), tiaminy (1 mg/l), kwasu nikotynowego (0,5 mg/l) i pirydoksyny (0,5 mg/l). Do zainicjowania tworzenia pędów przybyszowych oraz kalusa z różnych eksplantatów siewek buraka zastosowano następujące cytokiny: 6-benzylaminopurynę (BAP), thidiazuron (TDZ) i 6-( $\gamma,\gamma$  dwumetyloalliloamino) purynę (2iP) w stężeniach 0,2; 1,0; 2,0 mg/l. Kontrolę stanowiła pożywka bez dodatku regu-



latorów wzrostu. Na każdą kombinację stężenia cytokinin wykładano po 36 eksplantatów siewek (w trzech powtórzeniach). Kultury umieszczono w pokoju hodowlanym, w świetle ciągłym o natężeniu ok.  $40 \text{ mol}^{-3}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  i temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$ .

Obserwacje morfogenezy eksplantatów siewek buraka przeprowadzono po ośmiu tygodniach kultury. Określono procent eksplantatów, na których tworzył się kalus lub pędy przybyszowe. Przeprowadzono również ocenę morfologiczną tkanki kalusowej.

Uzyskane na eksplantatach pędy przenoszono na pożywkę regeneracyjną w celu ich rozmnożenia. Rozmnażanie prowadzono na pożywce MS z dodatkiem  $0,3 \text{ mg/l}$  BAP i  $0,1 \text{ mg/l}$  NAA. Po pierwszym pasażu określono ploidalność regenerantów na podstawie liczby chromosomów w wierzchołkach wzrostu pędów. Prawidłowo rozwinięte rośliny, po czterech tygodniach kultury na pożywce regeneracyjnej, przenoszono na pożywkę ukorzeniającą, zawierającą  $0,01 \text{ mg/l}$  2iP i  $3,0 \text{ mg/l}$  IBA. Ukorzeniazone w kulturach *in vitro* buraki przesadzono do doniczek o średnicy  $9 \text{ cm}$ , zawierających mieszaninę sterylizowanej gleby z piaskiem w stosunku 3:1 i umieszczono w kabinach o wysokiej wilgotności.

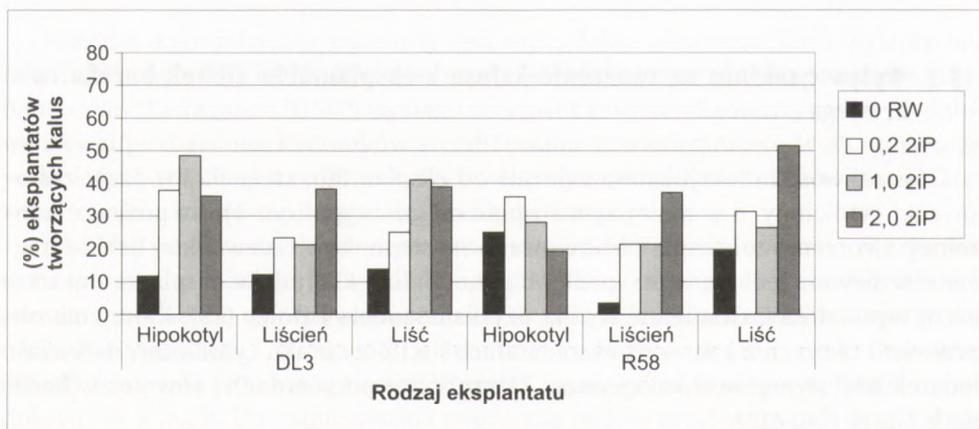
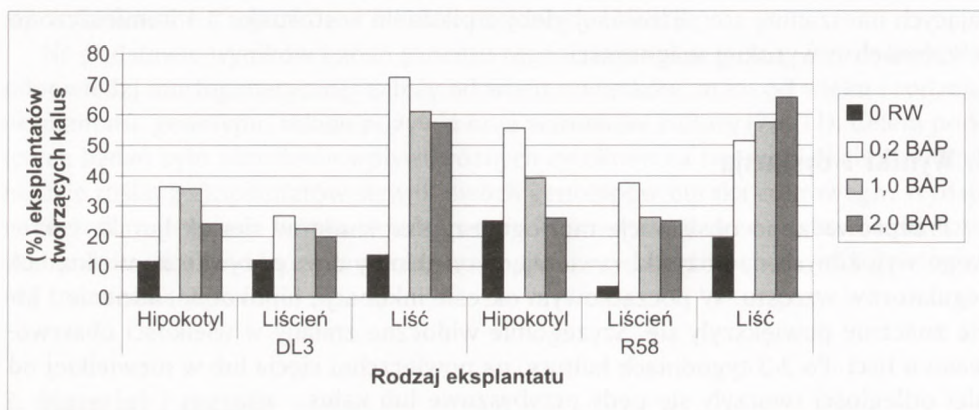
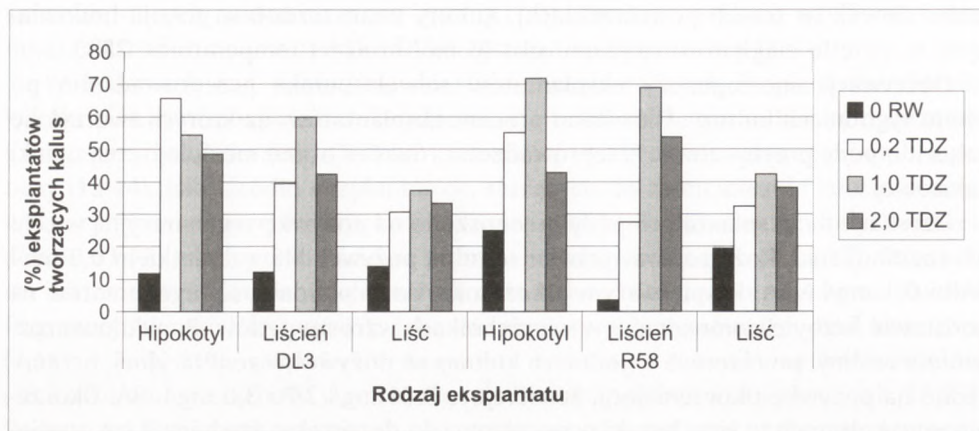
### 3. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzono obserwacje morfogenezy eksplantatów siewek buraka cukrowego wyłożonych na pożywki zawierające cytokininy oraz pożywkę kontrolną bez regulatorów wzrostu. W początkowym okresie inkubacji, hipokotyle, liścienie i liście znacznie powiększyły się. Szczególnie widoczne zmiany w wielkości obserwowano u liści. Po 2-3 tygodniach kultury, na powierzchni cięcia lub w niewielkiej od niej odległości tworzyły się pędy przybyszowe lub kalus.

#### 3.1. Wpływ cytokinin na tworzenie kalusa z eksplantatów siewek buraka cukrowego

Częstotliwość indukcji kalusa zależała od eksplantatu, stężenia i rodzaju zastosowanej cytokininy, a w mniejszym stopniu od genotypu (rys. 1). Na pożywce kontrolnej, tworzenie tej tkanki obserwowano na stosunkowo niewielkiej liczbie fragmentów siewek. Jedynie w przypadku hipokotyli linii R58 udział eksplantatów z kalusem wyniósł 25%. Odmiennie wyniki uzyskali Sanders i Doley (29), którzy nie obserwowali tworzenia kalusa na eksplantatach liści przy braku cytokininy, natomiast dodatek BAP stymulował kalogenezę. Zależność tę potwierdzono również w badaniach Gürel i in. (11).

Najwyższą częstotliwość tworzenia kalusa na eksplantatach siewek buraka cukrowego obserwowano na pożywkach zawierających TDZ (rys. 1). Optymalne stężenie TDZ dla badanych genotypów wynosiło  $1 \text{ mg/l}$ , oprócz hipokotyli linii DL3, gdzie



Rys. 1. Wpływ cytokinin na tworzenie kalusa na eksplantatach siewek buraka cukrowego.



niższa zawartość cytokininy (0,2 mg/l) zwiększała indukcję kalusa. W obecności tej cytokininy 71,9% eksplantatów hipokotyli, 69,0% liścieni oraz 42,4% liści tworzyło kalus. Zhang i in. (7) uzyskali podobne wyniki stosując TDZ w pożywce inicjalnej. Kalus tworzył się na około 40,0% wyłożonych blaszkach i 60,0% ogonkach liściowych.

Zastosowanie w pożywce inicjalnej BAP również stymulowało tworzenie kalusa na różnych eksplantatach siewek buraka cukrowego (rys. 1). Najwyższy procent indukcji kalusa uzyskano na eksplantatach liści linii DL3 (72,2%) na pożywce zawierającej 0,2 mg/l BAP. Wraz ze wzrostem stężenia tej cytokininy w pożywce obserwowano obniżenie zdolności wyszczepionych eksplantatów do tworzenia kalusa. Jedynie na liściach pochodzących z linii R58 najwyższą częstotliwość indukcji kalusa uzyskano na pożywce zawierającej 2,0 mg/l BAP (65,7%). Podobne wyniki uzyskali Krens i Jamar (8), którzy stwierdzili, że dla indukcji kalusa na eksplantatach hipokotyli, liścieni, ogonków liściowych i liści korzystniejsze były niższe stężenia BAP (0,05-0,25 mg/l). Obecność 2,0 mg/l BAP w pożywce wyraźnie hamowało kalogenezę, szczególnie na hipokotylach i liścieniach. Gürel i in. (11) natomiast stwierdzili, że wraz ze wzrostem koncentracji tej cytokininy więcej eksplantatów tworzyło kalus.

Zastosowane w niniejszej pracy, w pożywce inicjalnej 2iP stymulowało kalogenezę, jednak w nieco mniejszym stopniu niż TDZ i BAP (rys. 1). Korzystniejsze jednak okazały się wyższe stężenia tej cytokininy, na których wyłożone eksplantaty regenerowały częściej. Optymalnymi stężeniami były: 1,0 mg/l w przypadku hipokotyli i liści linii DL3 oraz 2,0 mg/l 2iP dla liścieni linii DL3 oraz liścieni i liści linii R58. Stwierdzono, że najmniej aktywną cytokininą w indukcji tkanki kalusowej była 2iP. Podobne wyniki uzyskał Saunders (16), który w celu zwiększenia indukcji kalusa na eksplantatach ogonków liściowych buraka cukrowego obok BAP, zeatyny i kinetyny zastosował 2iP. Stwierdził, że BAP i zeatyna bardziej stymulowały tworzenie tkanki kalusowej niż 2iP i kinetyna. Z tych względów 2iP była rzadziej stosowana w kulturach *in vitro* buraka cukrowego dla indukcji kalogenezy.

Kalus powstały na różnych eksplantatach siewek buraka cukrowego był zróżnicowany morfologicznie. W zależności od zastosowanych cytokinin tkanka kalusowa miała różną strukturę i zabarwienie. Jasnozielony, gruzełkowaty oraz luźny kalus tworzył się na eksplantatach siewek inkubowanych na pożywce zawierającej TDZ. Zielony oraz zbity obserwowano na podłożu z BAP. Natomiast na pożywce z 2iP, tworzący się kalus był kremowy, gruzełkowaty, nieco mniej zbity.

Uzyskany na eksplantatach siewek kalus przeniesiono na świeże pożywki, zawierające 1,0 mg/l BAP, TDZ lub 2iP. Po pierwszym pasażu nie obserwowano różnicowania pędów przybyszowych lub korzeni. Następował jedynie dalszy wzrost kalusa bez wyraźnych zmian w strukturze i kolorze tkanki. Pośredniej regeneracji pędów z kalusa otrzymanego z eksplantatów ogonków i blaszek liściowych nie obserwowali również Zhang i in. (7). Saunders i Daub (22) uzyskali regenerację pędów z kalusów dwóch genotypów, po pasażowaniu na pożywki zawierające 0,25; 1,0 lub 5,0 mg/l



BAP. Na pożywce zawierającej 1,0 mg/l BAP otrzymali najwyższy procent kalusów (77,8%) tworzących pędy przybyszowe. Autorzy zastosowali jednak inne warunki hodowli: inkubację prowadzono w temperaturze 30°C, a kalus otrzymano z eksplantatów liści pochodzących z kultur pędowych.

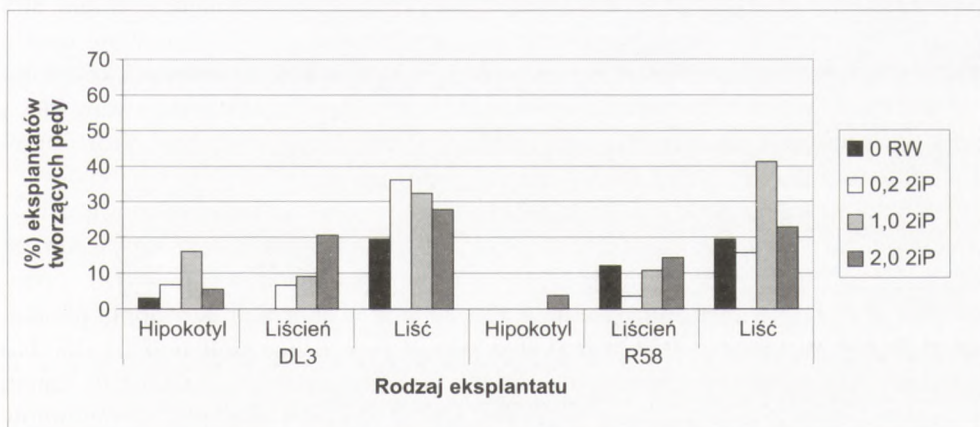
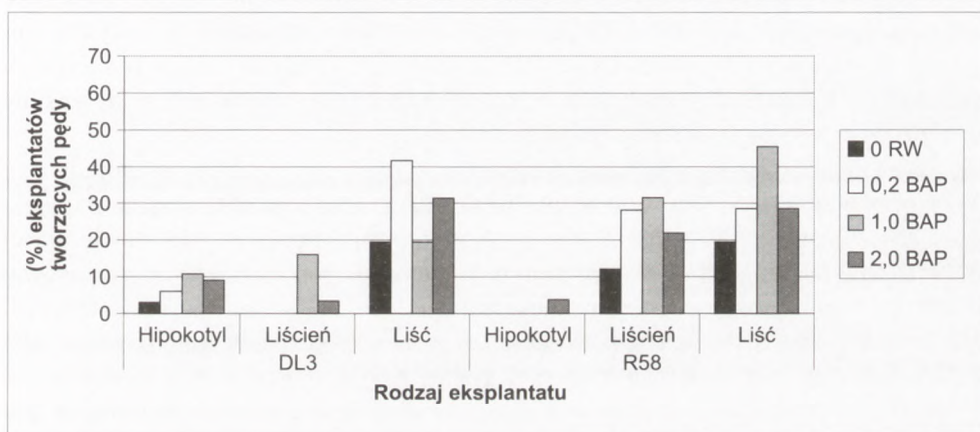
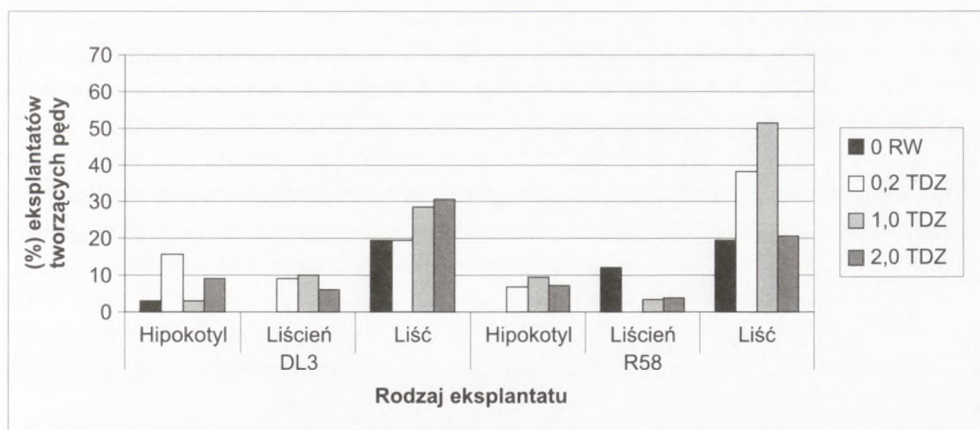
### **3.2. Wpływ cytokinin na regenerację pędów przybyszowych z eksplantatów siewek buraka cukrowego**

Drugim równoległym procesem, który zachodził na eksplantatach siewek buraka cukrowego inkubowanych na różnych pożywkach inicjalnych była bezpośrednia regeneracja pędów przybyszowych. Częstotliwość tworzenia pędów na eksplantatach siewek buraka cukrowego zależała od genotypu, rodzaju eksplantatu i zastosowanych cytokinin (rys. 2). Najwyższym potencjałem morfogenetycznym charakteryzowały się liście. Od 19,4 do 51,5% eksplantatów liści inkubowanych na różnych pożywkach inicjalnych tworzyło pędy przybyszowe. Detrez i in. (17) wykładając na pożywki tylko ogonki liściowe uzyskali od 15,0 do 68,2% regenerujących eksplantatów. Grieve i in. (6) wykorzystując ten sam rodzaj eksplantatu otrzymali nieco niższy procent regeneracji (10,0-53,0%).

Proces regeneracji pędów na eksplantatach siewek buraka cukrowego był wyraźnie stymulowany przez zastosowane w pożywce inicjalnej cytokininy. Na pożywce kontrolnej stwierdzono tworzenie pędów maksymalnie na 19,4% wyszczepionych fragmentów siewek, podczas gdy w obecności TDZ, przy stężeniu 1,0 mg/l, 51,5% eksplantatów wykazywało zdolność do organogenezy (rys. 2). Podobnie jak w przypadku kalogenezy, cytokininą o najwyższej aktywności była TDZ. Zhang i in. (7), traktując tym regulatorem wzrostu kielkujące nasiona buraka cukrowego również obserwowali korzystny wpływ na zdolności morfogenetyczne późniejszych eksplantatów. Błaszki i ogonki liściowe uzyskane w wyniku tego typu prekultury charakteryzowały się wysokim odsetkiem regeneracji – sięgający nawet 92%. Optymalnym stężeniem było 0,5 i 1,0 mg/l TDZ (7).

Dodatek BAP w nieco mniejszym stopniu stymulował organogenezę – do 45,5% eksplantatów siewek buraka cukrowego tworzyło pędy (rys. 2). Stwierdzono, że cytokinina ta w testowanym zakresie stężeń od 0,2 do 2,0 mg/l była czynnikiem indukującym regenerację pędów przybyszowych. W badaniach przeprowadzonych przez Detrez i in. (17) również wykazano, że stężenie BAP w zakresie od 0,1 do 3,0 mg/l w pożywce inicjalnej było optymalne dla zwiększenia częstotliwości tworzenia pędów. Dodatni wpływ tej cytokininy na odpowiedź morfogenetyczną różnych eksplantatów siewek buraka obserwowali także Grieve i in. (6).

Zastosowana w pożywce inicjalnej 2iP również stymulowała bezpośrednią organogenezę z eksplantatów hipokotyli, liścieni i liści, podobnie jak BAP (rys. 2). Jednakże w literaturze brak jest danych na temat wpływu tej cytokininy na regenerację roślin z różnych eksplantatów buraka cukrowego.



Rys. 2. Wpływ cytokinin na regenerację pędów z eksplantatów siewek buraka cukrowego.



W pracy stwierdzono, że genotyp rośliny rodzicielskiej miał wpływ na bezpośrednią regenerację pędów przybyszowych na eksplantatach siewek buraka. Niezależnie od rodzaju zastosowanej w pożywce inicjalnej cytokininy eksplantaty liści linii R58 charakteryzowały się wyższą zdolnością do regeneracji niż linii DL3. Uwzględniając najwyższe wartości otrzymane dla optymalnych stężeń TDZ, BAP i 2iP, 51,5% eksplantatów liści linii R58 tworzyło pędy. Natomiast na analogicznym eksplantacie linii DL3 maksymalny poziom regeneracji wynosił 41,7%. Liczni autorzy wykorzystujący w swoich doświadczeniach więcej niż jeden genotyp również obserwowali znaczne różnice genotypowe w zdolności do różnicowania eksplantatów buraka cukrowego (5,6,10,17).

Analizowano również wpływ miejsca pobrania hipokotyli i liścieni na zdolność do tworzenia pędów przybyszowych. Stwierdzono, że eksplantaty izolowane w niewielkiej odległości od wierzchołka wzrostu siewki wykazywały wyższy potencjał morfogenetyczny.

Regeneranty otrzymane z eksplantatów siewek buraka cukrowego różniły się morfologicznie w zależności od rodzaju zastosowanych cytokinin w pożywce inicjalnej. Na pożywkach zawierających TDZ i BAP obserwowano rośliny o szerokich ogonkach i wąskich blaszkach liściowych. Natomiast na pożywkach z 2iP rośliny miały długie ogonki i szerokie blaszki liściowe.

Na eksplantatach siewek buraka cukrowego tworzyły się głównie pojedyncze pędy przybyszowe, dlatego konieczne było ich rozmnożenie dla otrzymania większej ilości materiału. Rozmnażanie prowadzono na pożywce MS zawierającej 0,3 mg/l BAP i 0,1 mg/l NAA. Współczynnik namnażania, w zależności od zastosowanej cytokininy w pożywce inicjalnej wynosił od 3 do 5. Podobne wyniki otrzymali Miedema (2) oraz Grieve i in. (6). Według autorów współczynnik rozmnażania zależał od genotypu i wynosił średnio od 1 do 6.

Podczas rozmnażania na pożywce regeneracyjnej pędy nie tworzyły korzeni. Dobrze rozwinięte regeneranty przenoszono na pożywkę ukorzeniającą. Około 80% pędów regenerowało prawidłowo rozwinięty system korzeniowy. Nie stwierdzono wpływu różnych cytokinin w pożywce inicjalnej na proces ukorzenia. Ukorzone rośliny w warunkach *in vitro* przenoszono do doniczek z wysterylizowaną glebą przy zastosowaniu odpowiedniej wilgotności. Odsetek regenerantów, które przeżyły przenoszenie do gleby był wysoki i wynosił ponad 90%.

W przeprowadzonych analizach ploidalności regenerantów uzyskanych z różnych eksplantatów siewek dwóch linii (R58 i DL3) buraka cukrowego wykazano, że wszystkie badane rośliny miały diploidalną liczbę chromosomów ( $2n = 18$ ). Zastosowane w pożywce inicjalnej cytokininy nie spowodowały zmian w stopniu ploidalności. Podobnie Tetu i in. (30) oraz Detrez i in. (17) analizując ploidalność roślin buraka uzyskanych na drodze bezpośredniej organogenezy nie stwierdzili zmian w liczbie chromosomów. Z kolei Jacq i in. (10,15) wykazali obecność tetraploidów (4-17%) wśród roślin zregenerowanych z kalusa pochodzącego z hipokotyli i liścieni.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że bezpośrednia regeneracja roślin z różnych eksplantatów siewek buraka cukrowego pozwala na otrzymanie regene-



rantów o genotypie rośliny rodzicielskiej, stabilnych cytologicznie. Opracowana metoda regeneracji poprzez bezpośrednią organogenezę z eksplantatów siewek umożliwia efektywne rozmnażanie wartościowych genotypów buraka przydatnych w hodowli i genetycznej transformacji.

## Literatura

1. Goška M., (1981), Biul. IHAR, 143, 171-175.
2. Miedema P., (1982), Euphytica, 31, 635-643.
3. Freytag A. H., Anand S. C., Rao-Arelli A. P., Owens L. D., (1988), Plant Cell Reports, 7, 30-34.
4. Goška M., (1999), Biul. IHAR, 212, 115-124.
5. Detrez C., Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S., (1988), J. Exp. Bot., 39, 917-926.
6. Grieve T. M., Gartland K. M. A., Elliott M. C., (1997), Plant Growth Regulation, 21, 15-18.
7. Zhang C. L., Chen D. F., Elliott M. C., Slater A., (2001), In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 37, 305-310.
8. Krens F. A., Jamar D., (1989), J. Plant Physiol., 134, 651-655.
9. Owens L. D., Eberts D. R., (1992), Plant Cell Tiss. Org. Cult., 31, 195-201.
10. Jacq B., Tetu T., Sangwan R. S., de Laat A., Sangwan-Norreel B. S., (1992), Plant Cell Reports, 11, 329-333.
11. Gürel S., Gürel E., Kaya Z., (2001), Turk. J. Bot., 25, 25-33.
12. Tenning P., Wremerch Wrich E., Kjarsgaard U. B., Lelu M. A., Nihlgard M., (1992), Plant Science, 81, 103-109.
13. Tsai C. J., Saunders J. W., (1995), J. Sugar Beet Res., 32, 215-227.
14. Kulshreshtha S., Coutts R. H. A., (1997), Plant Growth Regulation, 22, 87-92.
15. Jacq B., Tetu T., Sangwan R. S., de Laat A., Sangwan-Norreel B. S., (1993), Plant Breeding, 110, 185-191.
16. Saunders J. W., (1982), Plant Tissue Culture, 153-154.
17. Detrez C., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S., (1989), Theor. Appl. Genet., 77, 462-468.
18. Kruczkowska H., Miszke W., Pawłowska H., Skucińska B., (1989), Acta Agraria et Silvestria, 28, 33-42.
19. Rogozińska J. H., Goška M., (1982), Acta Soc. Bot. Pol., 51, 91-105.
20. Goška M., (1997), Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, Radzików, 1-81.
21. Saunders J. W., (1982), Crop Science, 22, 1102-1105.
22. Saunders J. W., Daub M. E., (1984), Plant Science Letters, 34, 219-223.
23. Konwar B. K., Coutts R. H. A., (1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Acad. Publ., 114-118.
24. Rady M. R., (1997), Biologia Plantarum, 40, 515-522.
25. Goška M., Rogozińska J., (1988), Hod. Roślin Aklim. Nas., 32, 5/6, 87-96.
26. Krens F. A., Jamar D., Rouwendal G. J. A., Hall R. D., (1990), Theor. Appl. Genet., 79, 390-396.
27. Lenzner S., Zoglauer K., Schieder O., (1995), Physiologia Plantarum, 94, 342-350.
28. Murashige T., Skoog F., (1962), Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
29. Saunders J. W., Doley W. P., (1986), J. Plant Physiol., 124, 473-479.
30. Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S., (1987), J. Exp. Bot., 38, 506-517.