



Oxycoccus quadripetalus Gilib. w kulturze *in vitro*

Katarzyna Floryanowicz-Czekalska, Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny
Łódź

Oxycoccus quadripetalus Gilib. in *in vitro* culture

Summary

Oxycoccus quadripetalus callus induction and study on its capacity to regenerate shoots and/or roots were established. Woody Plant Medium (WPM) with 2iP (10 μM) and NAA (1 μM) was most suitable for callus tissue induction. The highest frequency of shoot regeneration was observed on WP Medium supplemented with TDZ (0,2 μM) and NAA (1 μM). Multiplication of *O. quadripetalus* shoots from seedling shoot tips was also realized. *Ca* 3 (7 cm long) shoots with 11 nodes per shoot were differentiated from one explant.

Key words:

Oxycoccus quadripetalus, callus induction, shoot regeneration.

1. Wstęp

Oxycoccus quadripetalus Gilib., żurawina błotna (rodzina *Ericaceae*), to krzewinka od dawna stosowana w medycynie ludowej, a od połowy XX w. również w medycynie konwencjonalnej. Sok z żurawiny znany jest ze swej skuteczności w profilaktyce przeciwko zapaleniu dróg moczowych, za co prawdopodobnie odpowiedzialne są cykliczne proantocyjanidyny obecne w owocach (1). Ponadto opisano antyoksydacyjne i przeciwzakrzepowe właściwości flawonoidów (2) oraz przeciwnowotworowe działanie antocyjanów i proantocyjanidyn (3) zawartych w owocach.

Żurawina błotna rozmnaża się głównie wegetatywnie. Gatunek ten wykazuje także zdolność do rozwoju generatywnego, jednak tylko 45% zalążków spośród 20 występujących w zalążni

Adres do korespondencji

Katarzyna
Floryanowicz-Czekalska,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź;
e-mail:
botanika@pharm.am.lodz.pl

biotechnologia

2 (65) 225–230 2004

rozwicka się w dojrzale nasiona zawierające prawidłowo rozwinięte zarodki zygocyczne (4).

W pracy podjęto próby namnożenia pędów żurawiny błotnej z wierzchołkowych części siewek oraz regeneracji pędów poprzez organogenezę tkanki kalusowej. Zbadano także zależność organogenezy od eksplantatu, użytego podłoża oraz typu i stężenia cytokininy. W literaturze brak danych dotyczących hodowli *in vitro* gatunku *O. quadripetalus*. Opracowano natomiast model mikropropagacji innego gatunku żurawiny – żurawiny wielkoowocowej, *Vaccinium macrocarpon* (5,6).

2. Materiał i metody

2.1. Hodowle *in vitro*

Nasiona z Ogrodu Botanicznego w Łodzi po sterylizacji i usunięciu łupiny nasiennej wykładano na pożywkę Woody Plant (WP) (7) z kinetyną (0,2 μM) i kwasem giberelinowym (0,5 μM). Probówki z nasionami umieszczano w fitotronie w ciemności, a po wykiełkowaniu nasion (po 2 tygodniach) przeniesiono je na światło o natężeniu 40 $\mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$. Eksplantaty pozyskiwano z 4-tygodniowych siewek. Do indukcji tkanki kalusowej użyto fragmentów hipokotyli lub korzeni. Eksplantaty umieszczano na agarowej pożywce WPM lub Zimmermana (Z) (8) z kwasem naftylo-1-octowym (NAA) (1 μM) i jedną z trzech cytokinin: 6($\gamma\gamma$, dimetyloalliloamino)-puryną (2iP), 6-benzylaminopuryną (BAP) lub tidiazuronem (TDZ) w różnych stężeniach (tab.). Po 5 tygodniach oceniano: procent eksplantatów tworzących kalus, procent kalusów różnicujących pędy, liczbę pędów na kalus i procent kalusów różnicujących korzenie. Wierzchołkowe części siewek (pączek szczytowy + łodyżka nadliścieniowa) przenoszono na pożywkę WPM wzbogaconą w kwas indolilo-3-octowy (IAA) (0,5 μM), BAP (2 μM) i 2iP (25 μM). Uzyskane pędy po 5 tygodniach dzielono na fragmenty (0,7 cm) obejmujące pojedynczy węzeł, które umieszczano na pożywce WPM z tymi samymi regulatorami wzrostu (0,5 μM IAA, 2 μM BAP, 25 μM 2iP). Kultury prowadzono w fitotronie, przy ciągłym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi, na świetle o natężeniu 40 $\mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$, w temperaturze 26°C.

2.2. Statystyka

Doświadczenia obejmujące próby indukcji i organogenezy tkanki kalusowej *Oxycoccus quadripetalus* Gilib. na każdej z testowanych pożywek powtarzano 3-krotnie. Jedna próba obejmowała ok. 7 eksplantatów \pm błąd standardowy. Wyniki podane w tabeli są średnią z ok. 20 eksplantatów \pm błąd standardowy.

3. Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że jednym z istotnych czynników wpływających na indukcję i organogenezę tkanki kalusowej *O. quadripetalus* jest rodzaj użytej pożywki. Z dwóch pożywek wykorzystanych w pracy (Z i WPM) lepsza okazała się WPM. Dlatego pożywkę tę zastosowano w dalszych etapach badań. Również z pracy Marcotrigiano i McGlew (6) wynika, że podłoże WP było najodpowiedniejsze dla regeneracji pędów żurawiny wielkoowocowej. Przy jego zastosowaniu badacze uzyskali wyższy wskaźnik regeneracji pędów, niż na pożywce Andersona, Gamborga, czy Murashige i Skooga.

Indukcja tkanki kalusowej *O. quadripetalus* i jej zdolność do organogenezy zależała również od rodzaju cytokininy w pożywce WPM (tab.). Dla indukcji kalusa najlepsze (biorąc pod uwagę częstość powstawania kalusa i jego wielkość) było podłoże zawierające 2iP w stężeniu 10 μM . Najlepsze efekty w odniesieniu do regeneracji pędów z tkanki kalusowej uzyskano przy zastosowaniu TDZ w stężeniu 0,2 μM . W tych warunkach maksymalnie 47% kalusów regenerowało średnio 2-3 pędy przybyszowe o średniej długości 1,1 cm. Tkanka kalusowa była zwarta, gruzelkowata, w kolorze czerwonym ze względu na obecność antocyjanów (fot. 1). Po zwiększeniu stężenia TDZ do 5 μM częstość organogenezy znacznie się obniżyła; pędy tworzyło tylko 7% kalusów. W stężeniu 10 μM TDZ całkowicie hamowało zdolność kalusów do organogenezy. Z pracy Marcotrigiano i wsp. (5) wynika, że takie stężenie TDZ było odpowiednie dla bezpośredniej regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych żurawiny wielkoowocowej. W tych warunkach uzyskano średnio 9 pędów/eksplantat (5).

Mniej odpowiednią cytokininą do tworzenia pędów z tkanki kalusowej *O. quadripetalus* okazało się 2iP. Przy zastosowaniu tej cytokininy w stężeniu 10 μM pędy regenerowało tylko 15% kalusów zapoczątkowanych z hipokotyła. Przy użyciu wyższych stężeń 2iP (45 μM lub 80 μM) nie obserwowano już kaulogenezy. Zauważono, że 2iP we wszystkich zastosowanych stężeniach stymuluje zdolność kalusów do regeneracji korzeni. Do regeneracji pędów *V. macrocarpon* Qu i wsp. (9) stosowali 2iP w połączeniu z NAA lub bez tej auksyny. Badacze uzyskiwali lepsze efekty po wyeliminowaniu NAA z pożywki.

Przy zastosowaniu BAP jako cytokininy w ogóle nie obserwowano tworzenia pędów z tkanki kalusowej *O. quadripetalus*. Kalusy hodowane w tych warunkach wykazywały natomiast zdolność do ryzogenezy (tab.).

Tabela

Wpływ rodzaju eksplantatu i cytokininy na indukcję i organogenezę tkanki kalusowej *Oxycoccus quadripetalus* Gilib. na pożywce WPM wzbogaconej w NAA 1 μ M. Okres hodowli – 5 tygodni

Rodzaj odpowiedzi	Eksplantat	Cytokinina (μ M)								
		BAP			TDZ			2iP		
		1	8	21	0,2	5	10	10	45	80
% eksplantatów tworzących kalus	hipokotyl	100	100	67	90	83	80	100	83	100
	korzeń	80	87	100	93	80	80	67	67	75
% kalusów różnicujących pędy	hipokotyl	–	–	–	47	7	–	15	–	–
	korzeń	–	–	–	38	–	–	–	–	–
liczba pędów/kalus	hipokotyl	–	–	–	3	3	–	1	–	–
	korzeń	–	–	–	2	–	–	–	–	–
% kalusów różnicujących korzenie	hipokotyl	100	100	90	–	–	–	100	90	65
	korzeń	100	100	80	–	–	–	100	80	50

– brak odpowiedzi

Badając zależność między zdolnością kalusa *O. quadripetalus* do organogenezy a rodzajem eksplantatu zauważono, że nieco więcej pędów regenerowała tkanka kalusowa zapoczątkowana z hipokotyli, niż pochodząca z korzeni. W optymalnych warunkach, tj. przy zastosowaniu 0,2 μ M TDZ kalus indukujący pędy przybyszowe formował się na 47% hipokotyli i 38% korzeni (tab.).



Fot. 1. Regeneracja pąków i pędów z tkanki kalusowej powstałej z hipokotyli siewki *Oxycoccus quadripetalus*. Kalus hodowano na agarowej pożywce WP z TDZ (0,2 μ M) i NAA (1 μ M). Okres hodowli: 5 tygodni. Skala – 1 cm



Fot. 2. Namnażanie pędów *Oxycoccus quadripetalus* z wierzchołkowych części siewek na agarowej pożywce WP z 2iP (25 μ M), BAP (2 μ M) i IAA (0,5 μ M). Okres hodowli: 5 tygodni. Skala – 1 cm.

W badaniach nad mikrorozmnażaniem żurawiny błotnej przeprowadzono również mnożenie pędów z wierzchołkowych części siewek. Z jednego eksplantatu uzyskiwano średnio 3 długie (do 7 cm) pędy boczne z dużą liczbą węzłów (11/pęd) (fot. 2). Fragmenty pędów obejmujące pojedynczy węzeł umieszczane na świeżym podłożu rozwijały również 3 pędy boczne z 12 węzłami. Pędy ukorzeniano na pożywce WPM bez regulatorów wzrostu. W tych warunkach w ciągu 5 tygodni 67% pędów wytwarzało korzenie.

Praca finansowana przez UM w Łodzi w ramach działalności statutowej nr 503-312-1.

Literatura

1. Sobota A. E., (1984), Urol., 131, 1013-1016.
2. Rodowski S., (2001), Postępy Fitoterapii, 6, 28-31.
3. Bomsler J., Madhavi D. L., Singletary K., Smith M. A. L., (1996), Planta Med., 62, 212-216.

4. Baranec T., Durisova L., Kuna R., (1996), *Biologia*, 51, 31-35.
5. Marcotrigiano M., McGlew S. P., Hacett G., Chawla B., (1996), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44, 195-199.
6. Marcotrigiano M., McGlew S. P., (1991), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 116, 911-916.
7. Lloyd G., McCown B., (1980), *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
8. Zimmerman R. H., Broom O. C., (1980), in: Ed. Zimmerman R. H., *USDA-SEA Agr. Publ. ARR-NE-11*, Beltsville, Md., 44-47.
9. Qu L., Polashock J., Vorsa N., (2000), *Hort Sci.*, 35, 948-952.