



Wydajność mikrorozmnażania w kulturach *in vitro* wybranych gatunków chronionych z rodziny Asteraceae

Alina Trejgell, Andrzej Tretyn

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Micropropagation in *in vitro* culture efficiency of selected protected species Asteraceae

Summary

The aim of the present research was the assessment of efficiency of micropropagation system for selected species that belong to Asteraceae family, as well as analysis of morphological traits and plantlets ability to flower. The experimental material were shoot tips isolated from 7-day-old seedlings of *Leontopodium alpinum*, *Senecio macrophyllus*, *Carlina acaulis*, and *Cirsium pannonicum*. The shoot tips were transferred on the medium supplemented with BA (1 mg·dm⁻³), and NAA (0,1 mg·dm⁻³). The obtained shoots were transferred onto fresh medium with the same combination of growth regulator (3 subcultures). The shoots with 4 or more leaves were rooted on the half-strength MS medium without growth regulators for 4 weeks. The plantlets were acclimatized to *ex vitro* conditions and planted to the field. The analysis of flowering ability, leaves and flower morphology, and survival level were the objectives of the study. The plantlets were acclimatized in a greenhouse and planted to the field condition.

From 10 seeds of initial material one can obtain 24 278 plants of *Leontopodium alpinum*, 1507 of *Carlina acaulis*, 1261 of *Senecio macrophyllus*, and 37 of *Cirsium pannonicum* taking into consideration the percentage of seed germination, proliferation rate in three subcultures, frequency of microshoots rooting and survival rate during acclimatization. The regenerated plants demonstrated traits of donor plants and were able to flower and produce viable seeds.

Key words:

micropropagation, *Leontopodium alpinum*, *Senecio macrophyllus*, *Carlina acaulis*, *Cirsium pannonicum*.

Adres do korespondencji

Alina Trejgell,
Zakład Biotechnologii,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet
Mikołaja Kopernika,
ul Gagarina 9,
87-100 Toruń;
e-mail:
trejgell@biol.uni.torun.pl

1. Wstęp

Mikropropagacja w kulturach *in vitro* gatunków chronionych jest jedną ze strategii aktywnej ochrony gatunkowej *ex situ*. W przypadku gatunków zagrożonych wyginięciem, przy drastycznie zmniejszającej się liczbie ich stanowisk, regeneracja w kulturach *in vitro* jest możliwym sposobem zabezpieczenia puli genowej tych gatunków.

Mikropropagacja w warunkach *in vitro* przebiega w kilku etapach: 1) wyprowadzenie sterylnej kultury, 2) namnażanie, 3) ukorzenianie pędów i aklimatyzacja do warunków *ex vitro*. Namnażanie pędów zależy od warunków kultury, a przede wszystkim od rodzaju i wzajemnych proporcji regulatorów wzrostu. Obecność cytokinin i auksyn w pożywce w odpowiednich proporcjach ukierunkowuje rozwój eksplantatów na powstawanie kalusa i różnicowanie pąków przybyszowych w jego obrębie lub bezpośrednio z tkanek eksplantatu pierwotnego. Natomiast w kulturach pąków bocznych obecność cytokinin w podłożu (w stężeniu przewyższającym auksyny) hamuje dominację wierzchołkową, co powoduje rozwój pąków pachwinowych i tworzenie nowych pędów (1,2). Zastosowanie wysokich stężeń regulatorów wzrostu oraz warunki kultury *in vitro* takie jak duża wilgotność, czy rodzaj naczyń mogą wywoływać zaburzenia morfologiczne, anatomiczne i fizjologiczne regeneratów, zwłaszcza uzyskanych na drodze regeneracji pośredniej, poprzez kalus (3). Możliwość praktycznego wykorzystania roślin uzyskanych w kulturach *in vitro* zależy od tego czy powielają cechy roślin matecznych oraz czy są zdolne do kwitnienia i zawiązywania owoców. Dużą stabilność genetyczną zapewniają kultury pąków bocznych i dlatego są z powodzeniem stosowane do masowego rozmnażania wielu gatunków ozdobnych i sadowniczych, np. gerber (4), truskawek (5), malin (6), wiśni (7), czy jabłoni (8).

Celem przeprowadzonych badań była ocena wydajności systemu regeneracyjnego opracowanego dla wybranych gatunków należących do rodziny Asteraceae oraz analiza cech morfologicznych i zdolności do kwitnienia uzyskanych regeneratów.

2. Materiały i metody

Jako eksplantaty inicjalne zastosowano wierzchołki wzrostu pędów izolowane z 7-dniowych siewek *Leontopodium alpinum*, *Senecio macrophyllus*, *Carlina acaulis* oraz *Cirsium pannonicum*, gatunków należących do rodziny Asteraceae.

Nasiona uzyskano z kolekcji Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a nasiona *L. alpinum* i *C. acaulis* dodatkowo z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Alpine Botanical Garden w Rezia (Włochy). Nasiona poddano dezynfekcji w 70% (v/v) EtOH przez 30 s, a następnie 20% (v/v) NaOCl (Domestos) przez 20 min, po czym płukano sterylną wodą destylowaną. Wysterylizowane powierzchniowo nasiona kiełkowały na zmodyfikowanej pożywce MS (9)

z dodatkiem kwasu giberelinowego (GA_3) w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i zestalonej 0,7% (w/v) agarom. Do zainicjowania kultury wykładano po 100 nasion dla każdego gatunku. Wierzchołki wzrostu siewek wykładano na pożywkę MS uzupełnioną benzyloaminopurynę (BA) w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i kwasem α -naftalenoctowym (NAA) w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH pożywki doprowadzono do 5,7 przed autoklawowaniem. Kulturę prowadzono przez 4 tygodnie w temperaturze $26 \pm 1^\circ\text{C}$ na ciągłym świetle o natężeniu $40 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Rozwijające się pędy odcinano i pasażowano na świeżą pożywkę o takim samym składzie (trzy czterotygodniowe cykle). W każdym cyklu namnażania pędów dokonano oceny zdolności morfogenetycznej eksplantatów, analizowano liczbę eksplantatów zdolnych do rozwoju pąków bocznych (wyrażoną w %) oraz liczbę pędów na eksplantat (wskaźnik namnażania). Uzyskane w ostatnim pasażu pędy, posiadające co najmniej 4 liście przenoszono na pożywkę ukorzeniającą pozbawioną regulatorów wzrostu i ze zmniejszonym do połowy stężeniem soli (1/2 MS) w porównaniu do pożywki standardowej (9). Po 4 tygodniach hodowli ukorzone pędy przenoszono do warunków *ex vitro*. Regeneranty posadzono w doniczkach wypełnionych sterylną mieszaniną wermikulitu i piasku (1:1, v/v) i aklimatyzowano przez 2 tygodnie w fitotronie, a następnie przesadzono do doniczek wypełnionych ziemią z poletka doświadczalnego. Uprawę prowadzono w szklarni przez 4 tygodnie, po tym czasie rośliny przeniesiono do gruntu. W pierwszym roku wzrostu w gruncie oceniono przeżywalności roślin (wyrażoną w %), ich pokrój i morfologię liści oraz zdolność do kwitnienia i budowę kwiatostanów. Doświadczenia przeprowadzono trzykrotnie, 30 eksplantatów/pędów stanowiło każdy wariant doświadczenia. Wydajność systemów regeneracyjnych obliczono na podstawie uzyskanych parametrów uwzględniając siłę kiełkowania nasion, liczbę eksplantatów zdolnych do rozwoju pąków, wskaźnik namnażania w 3 kolejnych pasażach, frekwencję ukorzenia mikropędów oraz przeżywalność roślin podczas aklimatyzacji w przeliczeniu na 10 nasion (materiał inicjalny).

3. Wyniki i dyskusja

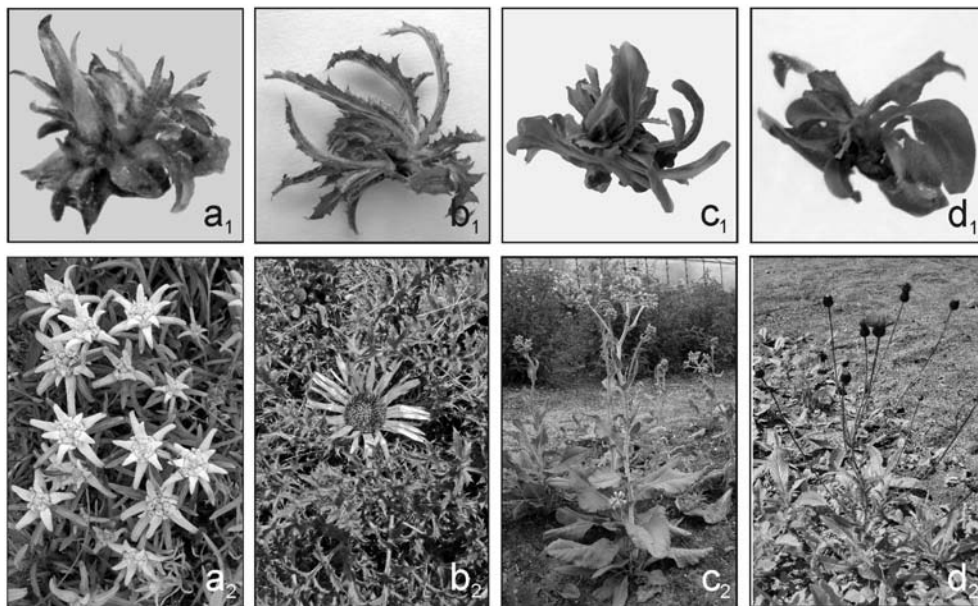
Nasiona *Leontopodium alpinum*, *Carlina acaulis*, *Senecio macrophyllus* oraz *Cirsium pannonicum* kiełkowały na pożywce MS wzbogaconych w GA_3 ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Siła kiełkowania dla 3 pierwszych gatunków była wysoka i wahała się w granicach 82-98% (tab.), natomiast w przypadku *C. pannonicum* jedynie 44% nasion kiełkowało, co znacząco wpływało na liczbę uzyskanych roślin podczas mikropropagacji.

Rozwój pędów pachwinowych stwierdzono na 100% eksplantatów pierwotnych *L. alpinum*, *C. acaulis* i *S. macrophyllus*, natomiast w przypadku *C. pannonicum* odsetek ten wynosił 84,5. Wskaźnik namnażania dla poszczególnych gatunków wynosił: 13,6 dla *L. alpinum* (fot. 1a₁), 7,5 dla *C. acaulis* (fot. 1b₁), 8,3 dla *S. macrophyllus* (fot. 1c₁), a dla *C. pannonicum* jedynie 1,9 pędów na eksplantat (fot. 1d₁, tab.). Po przeniesieniu uzyskanych pędów na pożywki o tym samym składzie (p2 i p3), uzyskano, naj-

Tabela

Gatunek	Etapu uzyskania zregenerowanych roślin											
	kiełkowanie		namnażanie pędów			ukorzenianie		aklimatyzacja		kwitnienie		
	(%)	liczba siewek	pasaż	wskaźnik namnażania	(%)	liczba pędów	(%)	liczba mikrosadzonek	(%)	liczba regeneratów	(%)	liczba osobników
<i>Leontopodium alpinum</i>	91	9,1	1	13,6	100	123	68,1	25 290	96,4	24 278	33,3	8012
			2	15,9	90,0	1771						
			3	21,0	100	37 190						
<i>Carlina acaulis</i>	98	9,8	1	7,5	100	73	94,1	1554	97,0	1507	46,4	693
			2	5,4	100	394						
			3	4,2	100	1654						
<i>Senecio macrophyllus</i>	82	8,2	1	8,3	100	68	87,1	1538	82,0	1261	53,6	668
			2	5,0	100	340						
			3	5,2	100	1768						
<i>Cirsium pannonicum</i>	44	4,4	1	1,9	84,5	7	100	40	93,3	37	64,3	24
			2	3,0	97,5	20						
			3	2,1	95,9	40						

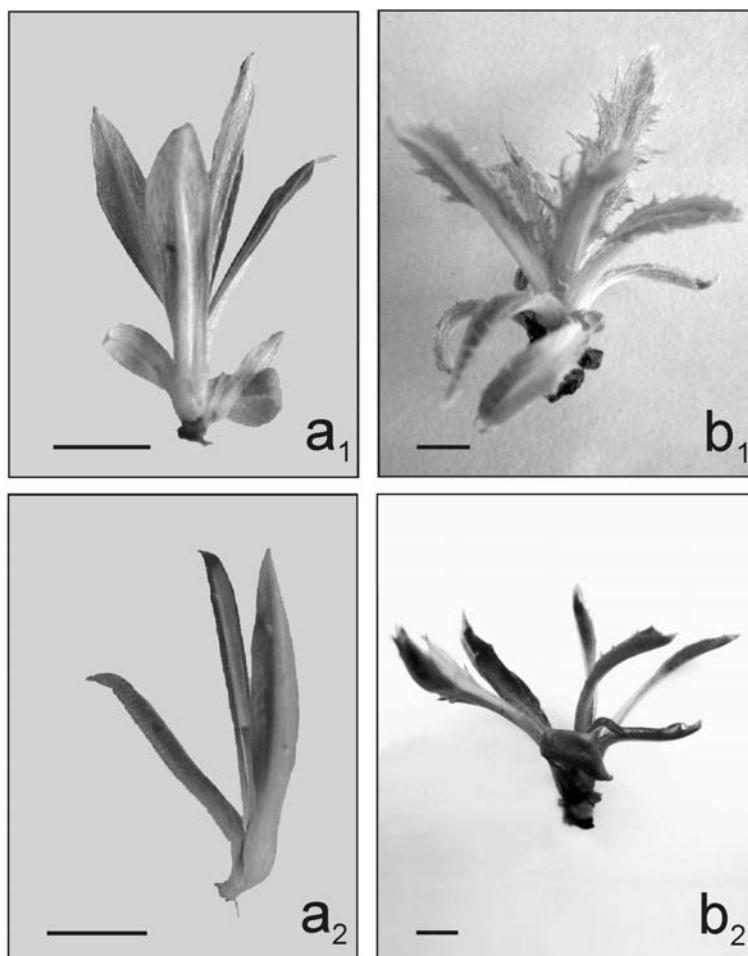
Pożywką: do namnażania pędów – MS uzupełniona BA [1 mg · dm⁻³] i NAA [0,1 mg · dm⁻³], do ukorzeniania – ½ MS bez regulatorów wzrostu.



Fot. 1. Mikrorozmnażanie wybranych gatunków Asteraceae. (a₁-d₁) pędy rozwijające się na wierzchołkach wzrostu na pożywce zawierającej BA [$1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$] i NAA [$0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]: (a₁) *Leontopodium alpinum*, (b₁) *Carlina acaulis*, (c₁) *Senecio macrophyllus*, (d₁) *Cirsium pannonicum* i (a₂-d₂) kwitnące regeneranty: (a₂) *Leontopodium alpinum*, (b₂) *Carlina acaulis*, (c₂) *Senecio macrophyllus*, (d₂) *Cirsium pannonicum*.

wyższy wskaźnik namnażania dla *L. alpinum*, który wynosił odpowiednio 15,1 i 21,0 (tab. 1), natomiast najniższą efektywność namnażania pędów obserwowano dla *C. pannonicum*, gdzie liczba pędów na eksplantat dla kolejnych dwóch pasaży wyniosły 3,0 i 2,1 (tab.). Wskaźnik namnażania pędów uzyskany w kolejnych cyklach dla gatunków użytych w badaniach miał podstawowe znaczenie dla wydajności systemów regeneracyjnych i był porównywalny do wskaźników uzyskanych dla innych gatunków z rodziny Asteraceae rozmnażanych w kulturach wierzchołków wzrostu lub pąków bocznych. Stosując pożywki wzbogacone w BA uzyskano 16 pędów/eksplantat dla *Artemisia vulgaris* (10), a dla *Saussurea lappa* wskaźnik namnażania wynosił 15 (11). W przypadku *Centaurea repeteis* (12) i *Santolina canescens* (13) liczba pędów nie przekraczała 10 na eksplantat. Natomiast dla *Achillea filipendulina* (14), czy *Arnica montana* (15) uzyskano stosunkowo niski wskaźnik namnażania, odpowiednio 3,7 i 1,4 pędu/eksplantat. We wcześniejszych badaniach nad regeneracją *C. acaulis* i *L. alpinum* stwierdzono, że eksplantaty liścieniowe i hypokotyłowe wykazywały także zdolności morfogenetyczne, jednak efektywność organogenezy pędów była niska (16,17).

Obecność BA w pożywce wpływała hamująco na wzrost pędu i rozwój blaszki liściowej w porównaniu do pędów rozwijających się na MS bez regulatorów wzrostu. Ponadto, obserwowano występowanie szklistości liści, jednak dotyczyło ono mniej



Fot. 2. Odcięte pędy *Leontopodium alpinum* (a) i *Carlina acaulis* (b) uzyskane podczas mikrorozmnażania. (a₁-b₁) liście z kutnerem, (a₂-b₂) liście bez kutneru (bar = 1cm).

niż 1% pędów. W przypadku *L. alpinum* i *C. acaulis* oprócz pędów z typowo wykształconymi liśćmi (fot. 2 a₁ i b₁), obserwowano pędy o liściach pozbawionych włosków kutnerowych charakterystycznych dla tych gatunków (fot. 2 a₂ i b₂), co obserwowano już wcześniej w badaniach nad *C. acaulis* subsp. *simplex* (18). Było to zjawisko o charakterze przejściowym i liście rozwijające się w warunkach *ex vitro* wykazywały typową dla gatunku morfologię.

Ukorzenianie pędów analizowanych gatunków nie wymagało zastosowania auksyn, co można tłumaczyć wysokim stężeniem endogennych auksyn (3). Wydajność ukorzeniania była bardzo wysoka i wynosiła 100% *C. pannonicum*, 94,1% dla *C. acaulis* oraz 87,1% dla *S. macrophyllus*, natomiast odsetek ukorzenionych pędów *L. alpinum*

był najniższy i wynosił 68,1. We wcześniejszych badaniach nad mikropropagacją Asteraceae wydajne ukorzenianie na pożywkach bez auksyn stwierdzono, np. u *Guizotia abyssinica* (19), *Centaurea paui* (20), *Echinacea purpurea* (21), czy *Saussurea obvallata* (22).

Mikrosadzonki przenoszono do warunków *ex vitro*, przeżywalność roślin po 3 miesiącach uprawy w gruncie była wysoka i wynosiła od 82 do 97% w zależności od gatunku (tab.).

Na podstawie wartości uzyskanych parametrów w poszczególnych etapach mikrorozmnażania, uwzględniając liczbę eksplantatów zdolnych do rozwoju pąków (wyrażoną w %), wskaźnik namnażania w 3 kolejnych pasażach, odsetek ukorzenionych mikropędów oraz przeżywalności roślin podczas aklimatyzacji w przeliczeniu na 10 nasion (materiał inicjalny), uzyskano 24 278 osobników *Leontopodium alpinum*, 1507 *Carlina acaulis*, 1261 *Senecio macrophyllus* oraz 37 *Cirsium pannonicum*.

Zregenerowane rośliny rozwijały się prawidłowo, a ich pokrój i cechy morfologiczne liści były typowe dla gatunku. Rośliny były zdolne do kwitnienia już w pierwszym roku po przeniesieniu do warunków uprawy polowej (tab., fot. 1a₂.d₂). W budowie kwiatostanów nie zaobserwowano cech nietypowych, kwiaty były płodne, a zawiązane nasiona zdolne do kiełkowania.

4. Wniosek

Opracowany system mikrorozmnażania dla *Leontopodium alpinum*, *Carlina acaulis*, *Senecio macrophyllus* oraz *Cirsium pannonicum* jest wydajny, a regeneranty powielają cechy roślin matecznych. Uzyskane tą drogą rośliny mogą być wykorzystane do wzbogacenia kolekcji w ogrodach botanicznych, a w przypadku gatunków o walorach dekoracyjnych (*L. alpinum* i *C. acaulis*) opracowany system może posłużyć do produkcji ogrodniczej.

Literatura

1. Zenkteler E., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, red. Zenkteler M., 111-138, PWN, Warszawa.
2. Gaspar T., Kevers C., Faivre-Rampant O., Cre` Vecoeur M., Penel C., Greppin H., Dommes J., (2003), *Biol.–Plant*, 39, 85-106.
3. Bach A., Pawłowska B., (2009), *Biotechnologia roślin*, red. Malepszy S., 21-40, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
4. Pierik R. L. M., Steegmans H. H. M., Marelis J. J., (1973), *Scientia Hort.*, 1, 117-119.
5. Boxus Ph., (1974), *J. Hort. Sci.*, 49, 209-210.
6. Sobczykiewicz D., (1992), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation*, Ed. Bajaj Y. P. S., 18, 339-353, II Springer-Verlag, Berlin.
7. Małodobry M., (2000), *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im H. Kołłątaja*, Kraków, 265, 68.
8. Xu J., Wang Y., Zhang Y., Chai T., (2008), *Acta Physiol. Plant.* 30, 129-132.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 437-497.

10. Sujatha G., Ranjitha Kumari B. D., (2007), *Acta Physiol. Plant.*, 29, 189-195.
11. Sudhakar Johnson T., Badari Narayan S., Narayana D. B. A., (1997), *In vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 33, 128-130.
12. Ćurković Perica M., (2003), *Acta Biologica Cracoviensia*, 45, 127-130.
13. Casado J. P., Navarro M. C., Utrilla M. P., Martinez A., Jiménez J., (2002), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 147-153.
14. Evenor D., Reuveni M., (2004), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, 91-93.
15. Trejgell A., Michalska M., Tretyn A., (2009), *Zeszyty Problemowe PNR*, 534, 289-296.
16. Trejgell A., Dąbrowska G., Tretyn A., (2009), *Acta Physiol. Plant.*, 31, 445-453.
17. Trejgell A., Bednarek M., Tretyn A., (2009), *Acta Biologica Cracoviensia*, 51/1, 97-103.
18. Trejgell A., Szczepanek D., Domżańska L., Tretyn A., (2010), *Propagation of Ornamental Plants*, 10/2, 81-87.
19. Sujatha M., (1997), *Euphytica*, 93, 89-95.
20. Cuenca S., Amo-Marco J. B., Parra R., (1999), *Plant Cell Reports*, 18, 674-679.
21. Korach A., Juliani H. R., Kapteyn J., Simon J. E., (2002), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 79-83.
22. Joshi M., Dhar U., (2003), *Plant Cell Reports*, 21, 933-939.