

TWORZENIE KALUSA I ORGANOGENEZA Z LIŚCIENI PAPRYKI W KULTURACH IN VITRO

Andrzej Gatz

Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy

WSTĘP

Dotychczas u papryki nie udało się uzyskać tak wydajnego systemu regeneracji jak u innych przedstawicieli Solanaceae [5]. Przebadano różne źródła eksplantatów papryki pod względem ich zdolności do pełnej regeneracji roślin. Były to między innymi wierzchołki pędu, hypokotyle i liścienie siewek, liście, pylniki, niedojrzałe zarodki a także protoplasty [1,3,5]. Biorąc pod uwagę zdolności regeneracyjne eksplantatów papryki, liścienie okazały się jednym z najlepszych źródeł [1,4]. O potencjale morfogenetycznym papryki decydują, oprócz inicjalnego źródła eksplantatu, także inne czynniki jak genotyp [7,9], regulatory wzrostu oraz warunki wzrostu takie jak długość fotoperiodu i temperatura [8].

Zadaniem niniejszej pracy było określenie zdolności organogenetycznych liścieni papryki.

MATERIAŁ I METODY

Nasiona *Capsicum annuum* L., cv. Bryza sterylizowano w 4% roztworze podchlorynu sodowego przez 7 minut, następnie plukano w sterylnej wodzie i wykładano na rozcieńczoną (1:1) pożywkę mineralną Murashige i Skoog'a (MS) (6) zestaloną agarrem (0,8%).

Z 4-tygodniowych sterylnych siewek papryki odcinano liścienie, które podzielono na dwie części (o długości około 22 mm): proksymalną (P) i dystalną (D). Eksplantaty umieszczano na pożywce horyzontalnie, stroną abaksjalną. Połówki liścienia na pożywce MS z IAA (kwas indolilo-3-octowy) i BAP (6-benzylaminopuryna) w stężeniach 0.2; 1.0; 5.0; 25.0 mg/l, pojedynczo lub w kombinacjach.

Kielkowanie nasion, wzrost siewek, jak również wzrost i różnicowanie eksplantatów zachodziło w warunkach 16h fotoperiodu, przy natężeniu światła około 3000 lx, w temperaturze $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Źródło światła stanowiły świetlówki LF-40 W. Doświadczenie wykonano w 2 powtórzeniach, przy czym każda kombinacja regulatorów wzrostu obejmowała 12 eksplantatów. Po upływie 4 tygodni określono zdolności morfogenetyczne liścieni.

WYNIKI

Izolowane eksplantaty liścieni papryki na pożywcę MS z regulatorami wzrostu wykazały zdolności do tworzenia kalusa, korzeni, pąków przybyszowych oraz struktur liściopodobnych.

Morfogenezę i wzrost eksplantatów części dystalnej oraz proksymalnej liścienia przedstawiają rysunki 1 i 2; dane dotyczące częstotliwości tworzenia pąków przybyszowych i korzeni na eksplantatach zamieszczone są na rysunku 3. Na pożywcę MS bez regulatorów wzrostu nastąpiło tylko minimalne powiększenie eksplantatów. Eksplantaty dystalnej i proksymalnej części liścienia w obecności samej auksyny wykazały zdolność do tworzenia tkanki kalusowej na powierzchniach cięcia, jednakże dalszy jej wzrost był ograniczony. Równocześnie z tworzeniem kalusa zachodziła ryzogenezę. Różnicowanie korzeni następowało na wszystkich eksplantatach dystalnej jak i proksymalnej części liścienia przy stężeniach 5.0 i 25.0 mg/l IAA (rysunek 3).

Z kolei pojedynczo zastosowana cytokinina nie tylko indukowała powstawanie kalusa, ale również przy najwyższym stężeniu (25.0 mg/l BAP) różnicowanie pąków przybyszowych. Tworzyły się one na obu typach eksplantatów a efektywność tego procesu wynosiła 8-33% (rysunek 3).

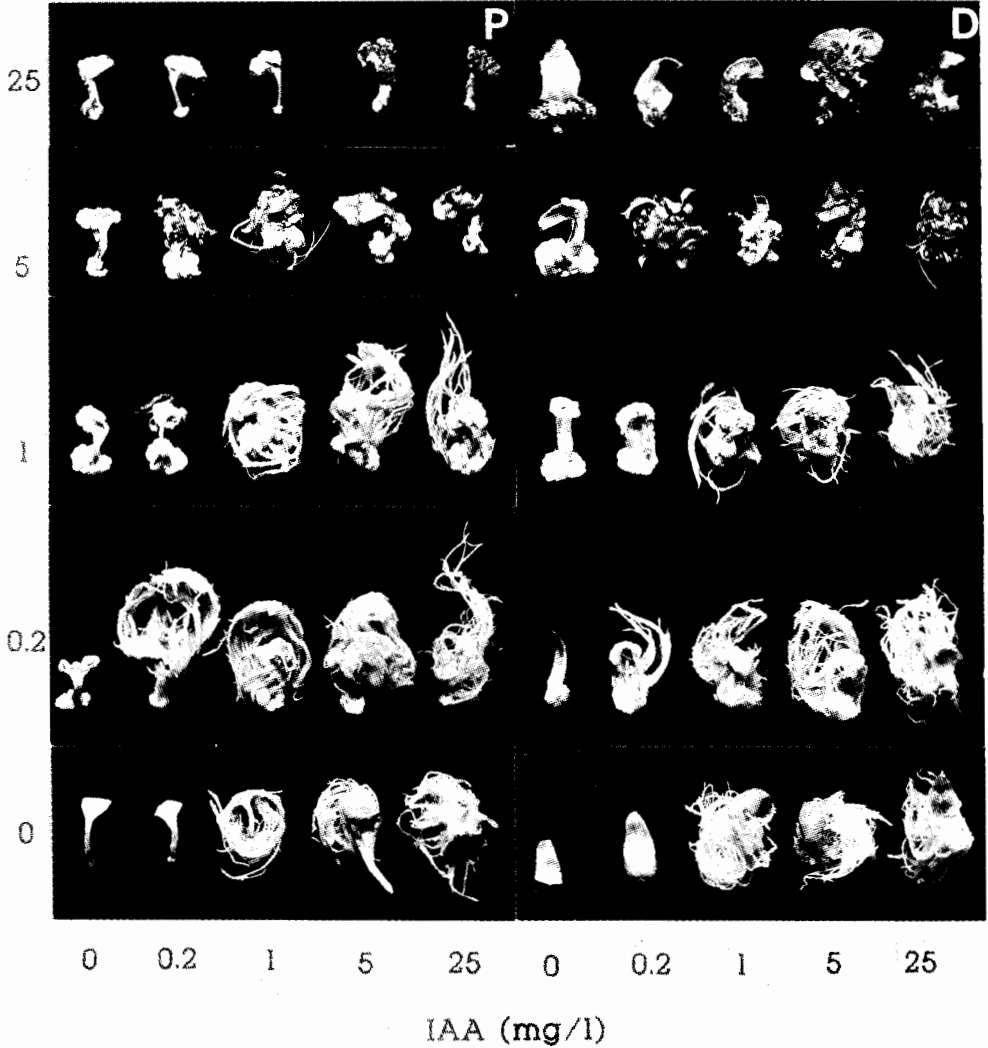
Znacznie lepsze wyniki odnośnie indukcji kalusa, ryzogenezę oraz tworzenia pąków i struktur liściopodobnych uzyskano stosując kombinację IAA + BAP (rysunek 2, 3). Na pożywkach z 0,2 mg/l BAP + IAA (0.2; 1.0; 5.0; 25.0 mg/l) zwiększył się procent liścieni tworzących korzenie (rysunek 3), zwłaszcza przy niższych stężeniach IAA (0.2 i 1.0 mg/l). Powierzchnie cięcia eksplantatów pokrywał biały, zbity kalus (rysunek 1) i podobnie jak na pożywkach z samą auksyną, nie uzyskano różnicowania.

Zwiększenie stężenia BAP do 1.0 mg/l w kombinacjach z poszczególnymi stężeniami IAA (rysunek 3) wpłynęło na indukcję pąków przybyszowych, przy jednoczesnym niewielkim obniżeniu częstotliwości ryzogenezę. Indukcja pąków zachodziła po stronie eksplantatu będącej w kontakcie z pożywką. Na wyżej wymienionych kombinacjach regulatorów wzrostu zachodził także optymalny wzrost tkanki kalusowej (rysunek 1). Obfity, zbity kalus rósł szczególnie intensywnie na powierzchniach cięcia eksplantatów (rysunek 2), lecz nie wykazywał zdolności do organogenezę.

Jak wynika z rysunku 3, przy kombinacji 5.0 mg/l BAP z badanymi stężeniami IAA obserwowano wzrost liczby eksplantatów, na których różnicowały się pąki przybyszowe i znaczne obniżenie liczby eksplantatów tworzących korzenie. Pożywka MS zawierająca 5.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IAA okazała się optymalną dla indukcji pąków na części proksymalnej liścienia. Po 3 tygodniach wzrostu niektóre z zaindukowanych pąków rozwinęły się w struktury liściopodobne (rysunek 2). Wzrost kalusa nie był już tak intensywny jak na pożywkach zawierających 1.0 mg/l BAP i IAA w różnych stężeniach (rysunek 1).

Dalsze zwiększenie stężenia BAP do 25.0 mg/l w pożywkach z IAA wpłynęło na obniżenie częstotliwości tworzenia pąków przybyszowych na eksplantatach, głównie przy niższych stężeniach IAA (0.2 i 1.0 mg/l), przy czym równocześnie następowało całkowite zahamowanie ryzogenezę (rysunek 3). Indukcja tkanki kalusowej wystę-

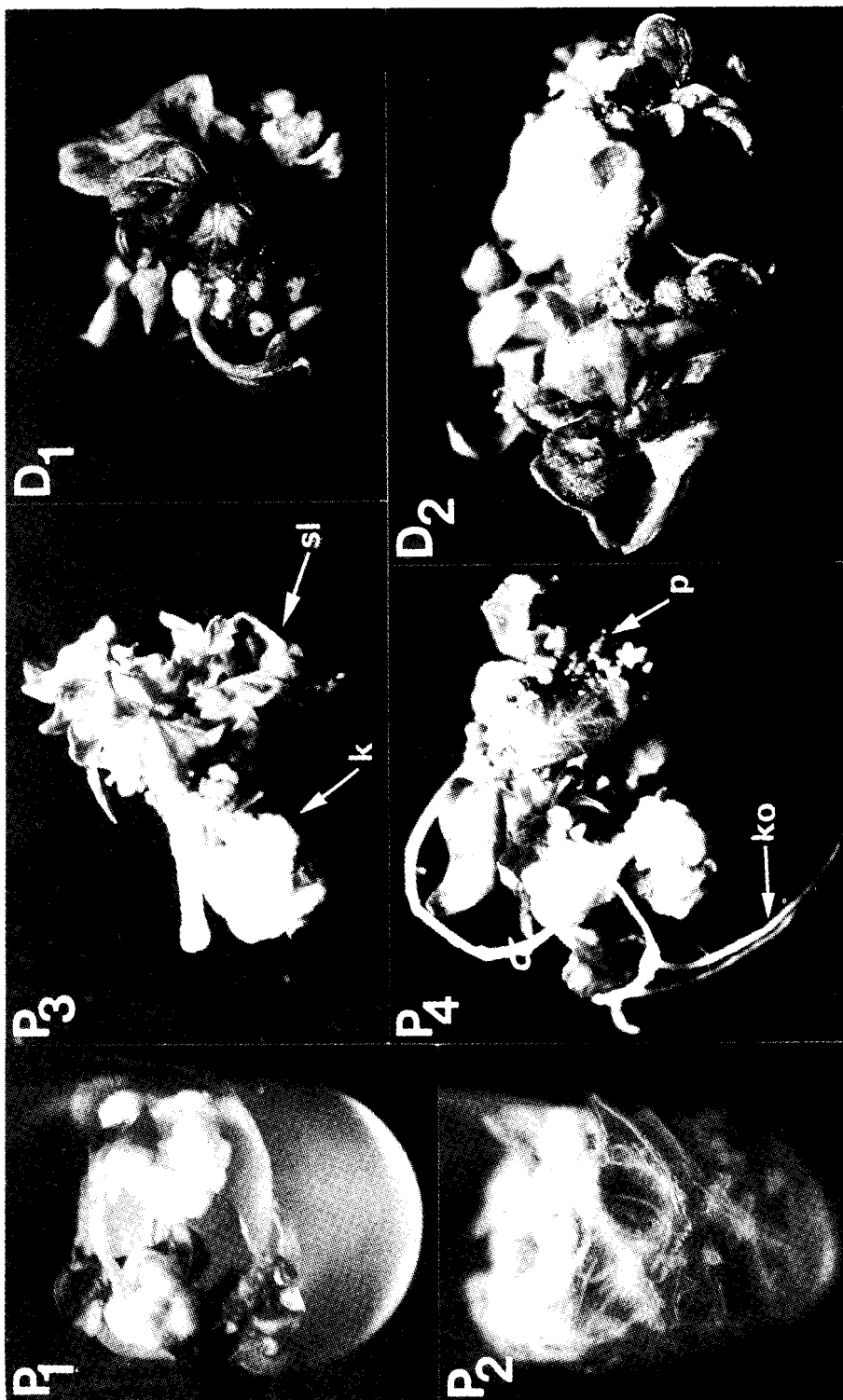
BAP (mg/l)



Rysunek 1. Wpływ IAA/BAP na tworzenie kalusa i organogenezę w eksplantatach proksymalnej (P) oraz dystalnej (D) części liścienia papryki

Figure 1. The effect of IAA/BAP on organogenesis in proximal (P) and distal (D) cotyledon part of pepper

powąla głównie na eksplantatach liścieniowych inkubowanych na pożywkach z 25.0 mg/l BAP w kombinacjach z niższymi stężeniami IAA (0.2 i 1.0 mg/l). Natomiast BAP (25.0 mg/l) w kombinacji z wyższymi poziomami IAA (5.0 i 25.0 mg/l) stymulowała rozwój struktur liściopodobnych (rysunek 1). Przy stężeniu 25.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l IAA na wszystkich eksplantatach dystalnej części liścienia następowała indukcja pąków (rysunek 1).



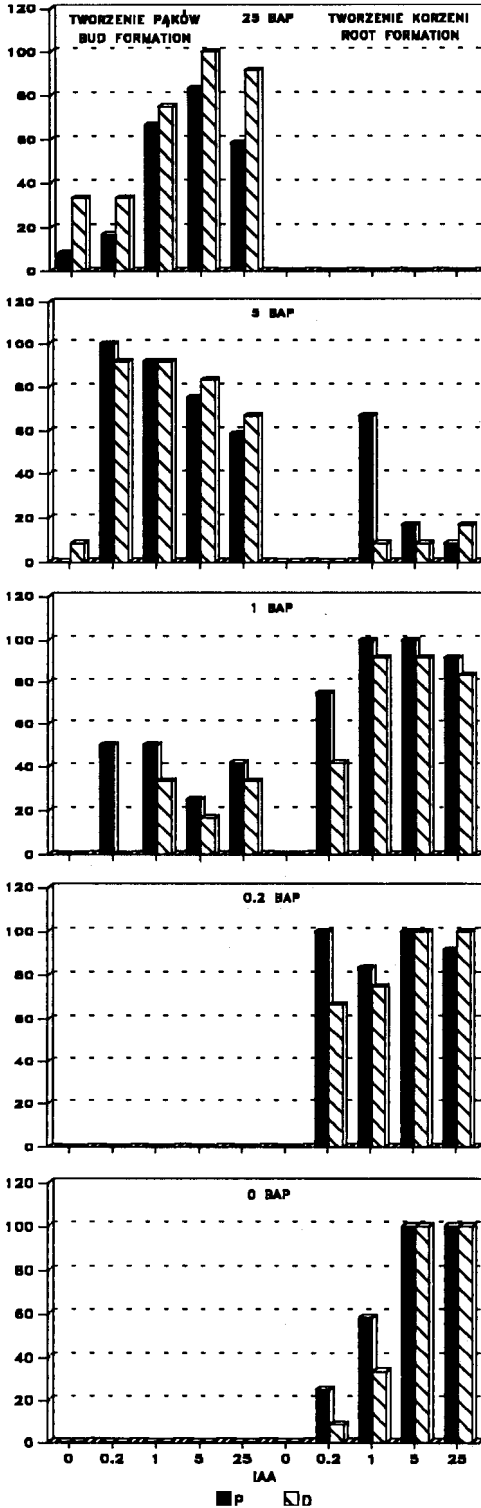
Rysunek 2. Tworzenie pąków przybyszowych (p), struktur liściopodobnych (sl), korzeni (ko) oraz kalusa (k) na eksplantatach proksymalnej (P_1 - P_4) i dystalnej (D_1 - D_2) części liścia papryki w obecności IAA/BAP

P_1 - 0.2 mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP	D_1 - 0.2 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP
P_2 - 1.0 mg/l IAA + 0.2 mg/l BAP	D_2 - 5.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP
P_3 - 0.2 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP	
P_4 - 1.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP	

Figure 2. Adventitious bud (p), leaf-like structure (sl), root (ko) and callus (k) formation in explants of proximal (P_1 - P_4) and distal (D_1 - D_2) cotyledon part of pepper, in presence of IAA/BAP

P_1 - 0.2 mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP	D_1 - 0.2 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP
P_2 - 1.0 mg/l IAA + 0.2 mg/l BAP	D_2 - 5.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP
P_3 - 0.2 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP	
P_4 - 1.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l BAP	

INDUKCJA ORGANOGENEZY W EKSPLANTATACH LIŚCIENI PAPRYKI (%)
ORGANOGENESIS INDUCED IN COTYLEDON EXPLANTS OF PEPPER (%)



Rysunek 3. Wpływ IAA (mg/l), BAP (mg/l) oraz ich kombinacji na organogenezę z liścieni papryki
P – część proksymalna D – część dystalna

Figure 3. The effect of IAA (mg/l), BAP (mg/l) and their combinations on organogenesis from cotyledon of pepper
P – proximal part D – distal part

Z przeprowadzonych badań wynika, iż zarówno część dystalna jak i proksymalna liścienia zdolna jest do organogenezy, chociaż nieco większy potencjał morfogenetyczny posiada ta ostatnia. Ponadto wykazano, że dla optymalnego tworzenia pąków przybyszowych niezbędne jest współdziałanie cytokininy z auksyną. Badania histologiczne nad określeniem różnicowania się pąków – bezpośrednio z eksplantatów czy za pośrednictwem kalusa – są w toku.

DYSKUSJA

Z przeprowadzonych badań wynika, iż eksplantaty dystalnej jak i proksymalnej części liścienia papryki cv. Bryza w zależności od zastosowanych regulatorów wzrostu, zdolne są do tworzenia kalusa, korzeni i pąków przybyszowych. W obecności samej cytokininy pąki przybyszowe tworzyły się na obu typach eksplantatów, lecz z niską wydajnością i tylko przy najwyższym stężeniu. Natomiast zastosowanie kombinacji BAP + IAA wpłynęło na różnicowanie pąków już przy niższym poziomie cytokininy. Efektywne współdziałanie auksyn (kwas indolilo-3-octowy, kwas indolilo-3-maslowy, kwas naftylo-1-octowy, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) z cytokininami (6-benzyloaminopuryna, kinetyna, zeatina) w indukcji pąków przybyszowych na eksplantatach liścieniowych papryki opisali także Gunay i Rao [4] oraz Phillips i Hubstenberger [8]. Najliczniej pąki przybyszowe tworzyły się na eksplantatach liścieni w obecności wyższych stężeń BAP w kombinacji z IAA, zakres tych stężeń wahał się od 2.0-50.0 mg/l i zależał od badanego genotypu i czynników egzogennych.

Również w niniejszej pracy wykazano współdziałanie BAP z IAA w indukcji pąków przybyszowych i stymulujący wpływ wyższych stężeń BAP (5.0 i 25.0 mg/l). Oprócz liścieni także inne eksplantaty takie jak: dojrzałe zarodki, wierzchołki pędu, hypokotyle, czy liście papryki [1,8] wymagają do różnicowania pąków wyższych poziomów cytokininy.

W przeprowadzonych badaniach uzyskano różnicowanie pąków przybyszowych z porównywalną częstotliwością na obu badanych częściach liścienia, chociaż na części proksymalnej indukcja korzeni i pąków przybyszowych była nieco wyższa. Większe różnice w zdolnościach organogenetycznych obu części liścienia otrzymali Arroyo i Revilla [2]. Stosując dwie odmiany papryki (Pico, Piquillo), uzyskali różnicowanie pąków przybyszowych na części proksymalnej liścienia z częstotliwością 2-krotnie większą niż na części dystalnej. Różnice w indukcji pąków na analogicznych częściach liścienia u różnych odmian papryki można wytłumaczyć między innymi różną wielkością eksplantatów, czy też odmiennością genotypową, która jak wiadomo jest jednym z ważniejszych czynników decydujących o zdolnościach regeneracyjnych [7,9]

Uzyskane wyniki badań pozwoliły określić warunki regeneracji papryki cv. Bryza z eksplantatów liścieniowych, a także poszerzyły wiedzę o zakresie odpowiedzi morfogenetycznej liścieni w zależności od stężeń użytych regulatorów wzrostu i ich kombinacji. Stanowią one wstęp do dalszych badań nad określeniem warunków dla pełnej regeneracji roślin z pąków przybyszowych liścieni.

LITERATURA

1. Agrawal S., Chandra N., Kothari S.L. (1989). Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 16, 47-55.
2. Arroyo R., Revilla M.A. (1991). In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports*, 10, 414-416.
3. Fari M. (1986). Pepper (*Capsicum annuum* L.). W: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 2, wyd. Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 345-362.
4. Gunay S., Rao P.S. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Sci. Lett.*, 11, 365-372.
5. Harini I., Lakshmi Sita G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89, 107-112.
6. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
7. Ochoa-Alejo N., Ireta-Moreno L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of Chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Hort.*, 42, 21-28.
8. Phillips G., Hubstenberger J.F. (1985). Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 4, 261-269.
9. Rogozińska J., Tobolewska G. (1992). Genotypic variations in organogenesis of six cultivars of pepper, *Capsicum annuum* L. *Genetica Polonica*, 33, (3), 213-217.

STRESZCZENIE

Na eksplantatach liścieniowych *Capsicum annuum* L., cv. Bryza auksyna (IAA) indukowała tworzenie tkanki kalusowej oraz korzeni. Natomiast cytokinina (BAP) stymulowała nie tylko wzrost kalusa, ale również przy najwyższym stężeniu, tworzenie pąków przybyszowych. Dla wydajnego tworzenia pąków jak i korzeni niezbędna jest obecność obu regulatorów wzrostu. Nie wykazano większego wpływu czynnika endogennego (część dystalna i proksymalna liścienia) na zdolności regeneracyjne.

CALLUS FORMATION AND ORGANOGENESIS FROM COTYLEDONS OF PEPPER CULTURED IN VITRO

A. Gatz

Department of Plant Physiology, University of Technology and Agriculture in Bydgoszcz

S u m m a r y

Auxin (IAA) induced callus and root formation in cotyledon explants of *Capsicum annuum* L., cv. Bryza. On the other hand cytokinin (BAP) at the highest concentration stimulated not only callus growth, but also adventitious bud formation. The usage of IAA/BAP combinations is necessary to obtain an efficient adventitious bud and root formation. The endogenous factor (distal and proximal parts of cotyledon) did not affect on the regeneration capability significantly.