

---

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXI

SECTIO E

2006

---

<sup>1</sup> Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza w Lublinie  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, Poland

<sup>2</sup> Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

Romuald Doliński<sup>1</sup>, Manal Mohamed Mohamed Hefny<sup>2</sup>

*Regeneracja roślin lucerny mieszańcowej (*Medicago sativa* L.  
subsp. *falcata* x subsp. *sativa*) z wierzchołków pędów*

---

Regeneration of hybrid lucerne (*Medicago sativa* L. subsp. *falcata* x subsp. *sativa*)  
plants from shoot tips

ABSTRACT. Shoot tips (3–4 mm) were cut from young plants (7 days) and then placed on Petri dishes, on 12 inducing media. All media contained macroelements and a four times higher concentration of microelements as in MS medium, vitamins from B<sub>5</sub> medium, 100 mg l<sup>-1</sup> of myo-inositol, 0.5 g l<sup>-1</sup> of proline and 3% sucrose. They differed with BAP content (2, 4, 6 mg l<sup>-1</sup>) and NAA (0.2, 0.4, 0.6 mg l<sup>-1</sup>). Explants were kept for 2 weeks in the dark at 23°C, then placed on MS medium complemented with 0.4 mg l<sup>-1</sup> of BAP and 0.04 mg l<sup>-1</sup> of NAA, and brought to cultivation room. After 4 and 8 weeks, 2–3-leaved shoots were cut and placed in half-strength MS medium without hormones in order to root them. All three alfalfa varieties showed the ability for plant regeneration from the apical buds. Single shoots developed from explants induced on control mediums without cytokinin. The highest shoot regeneration efficiency (4.24–4.45) was observed after induction on media containing 2 mg l<sup>-1</sup> of BAP. At the highest BAP concentration (6 mg l<sup>-1</sup>), the number of regenerated shoots decreased. Great differences as regarding the shoots regenerated by particular explants were observed (from 1 up to 11). About 52% of the shoots formed visible roots within 4 weeks. Almost 100% of the rooted plants transferred from *in vitro* cultures to pots survived.

KEY WORDS: *Medicago sativa*, micropropagation, shoot tips

Lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) należy do najważniejszych roślin pastewnych. Dostarcza dużych ilości wysokostrawnej paszy, bogatej w białko, sole mineralne i witaminy, skarmianej w postaci zielonki i siana. Jest uprawiana we wszystkich częściach świata, w różnych warunkach klimatycznych. Na tere-

nach o rocznej ilości opadów poniżej 600 mm jest najlepiej plonującą rośliną pastewną w uprawie polowej. Jej światowa powierzchnia uprawy jest szacowana na 32 mln ha [Hauptvogel i in. 1998], w Polsce zajmuje około 130 tys. ha [Wilczek 1999]. Pomimo dużego znaczenia gospodarczego należy do roślin o powolnym postępie hodowlanym. Duże nadzieje na zmianę tej sytuacji są związane z wprowadzeniem do hodowli tego gatunku nowych metod nazywanych biotechnologicznymi. Pozwalają one na prowadzenie selekcji w kulturach *in vitro* zamiast w polu (stresy chemiczne, patogeny), szybkie namnażanie komponentów odmian heterozyjnych. Umożliwiają powiększanie zmienności genetycznej przez wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych trudnych lub niemożliwych do otrzymania metodami tradycyjnej hodowli, celowe generowanie zmienności somaklonalnej, wytwarzanie odmian transgenicznych.

Głównym celem naszych badań było poznanie zdolności wybranych odmian lucerny mieszańcowej do regeneracji roślin z pąków wierzchołkowych. Podjęliśmy też próbę znalezienia kombinacji cytokininy i auksyny, dających największą efektywność regeneracji.

#### METODY

Badania wykonano na trzech polskich odmianach lucerny mieszańcowej ('Kometa', 'Tula' i 'Radius'). Nasiona odkażano przez 10 minut w 0,2%  $\text{HgCl}_2$  z dodatkiem kilku kropli płynu do zmiękczenia tkanin. Potem po wypłukaniu w sterylnej wodzie ( $3 \times 10$  min) i osuszeniu na sterylnej bibule wysiewano je po 10 do słoików (0,4 l) zawierających 25 ml zestalonej agarom (0,7 %) pożywki MS [Murashige, Skoog 1962] bez hormonów. Słoiki ustawiano na półkach pokoju hodowlanego (temp.  $23^\circ\text{C}$ , światło białe  $25\text{--}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperiod 16/8). Po siedmiu dobach ze sterylnych roślin wycinano wierzchołki pędów o długości 3–4 mm i wykładano je po cztery do szalek Petriego o średnicy 10 cm, na 12 pożywek indukcyjnych. Wszystkie zawierały makroelementy i czterokrotne stężenie mikroelementów z pożywki MS, witaminy z pożywki  $\text{B}_5$  [Gamborg i in. 1968] oraz:  $100 \text{ mg l}^{-1}$  mio-inozytolu,  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  proliny,  $30 \text{ g l}^{-1}$  sacharozy i 0,7% agaru. Różniły się zawartością kwasu 3-naftylooctowego (NAA) i 6-benzyloaminopuryny (BAP). Zastosowano cztery poziomy NAA (0, 0,2, 0,4 i  $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ ) i cztery stężenia BAP (0, 2, 4 i  $6 \text{ mg l}^{-1}$ ). Dla każdej pożywki i odmiany wykonano 15 powtórzeń ( $15 \times 4$  eksp.). Szalki trzymano przez dwa tygodnie w ciemności, w temp.  $23^\circ\text{C}$ . Po tym okresie oceniono rozwój pędów w skali 5-stopniowej, przełożono eksplantaty do słoików na pożywkę regeneracyjną i umieszczono na oświetlonych półkach pokoju hodowlanego. Nowa pożywka zawierała makro- i mikroelementy z pożywki MS, witaminy z pożywki  $\text{B}_5$  oraz  $0,4 \text{ mg l}^{-1}$  BAP i  $0,04 \text{ mg l}^{-1}$  NAA.

Po czterech tygodniach dalszego rozwoju pędów na pożywce regeneracyjnej liczono je, odcinano od eksplantatów, oceniano i przenoszono na pożywkę ukorzeniającą (pół steżona MS bez hormonów). Po odcięciu pędów eksplantaty pierwotne wykładano powtórnie na nową pożywkę, o niezmienionym składzie. Odcinanie i ocenę pędów powtórzono po następnych czterech tygodniach.

Etap ukorzenia oceniano po 28 dniach. Liczono rośliny i pędy nieukorzonię, oceniano ich rozwój w skali 5-stopniowej. Rośliny (pędy z co najmniej jednym korzeniem o długości większej od 1 cm) wysadzano do doniczek z ziemią ogrodniczą i poddawano hartowaniu.

Wyniki badań opracowano statystycznie na podstawie ocen wykonywanych na 40 genotypach z każdej kombinacji doświadczalnej. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami ocenianych cech szacowano metodą przedziałów ufności Tukeya.

#### WYNIKI

Do założenia kultur *in vitro* wykorzystaliśmy wierzchołki pędów odcinane ze sterylnych roślin i nie wymagały one odkażania. Przy takim postępowaniu można oczekiwać lepszych rezultatów niż przy stosowaniu eksplantatów z roślin rosnących w polu lub szklarni i wymagających odkażania. W czasie odkażania może dojść do uszkodzenia eksplantatów. Środki odkażające mogą też generować zmienność somaklonalną, a ich pozostałości źle wpływają na przebieg kultury. Przy odkażaniu złożonych eksplantatów, jak np. kwiatostany koniczyny, związki chemiczne nie docierają do wszystkich miejsc i mogą występować masowe zakażenia kultur grzybami i bakteriami, z tego powodu dużo eksplantatów zamiera [Skucińska, Miszke 1980; Cebrat i in. 1990a]. W tkankach niektórych roślin występują liczne endogenne mikroorganizmy i powierzchniowe odkażanie eksplantatów z roślin rosnących w niesterylnych warunkach daje słabe rezultaty [Yang, Choi 2000]. Jedną z przyczyn tracenia części genotypów na etapie indukcji organogenezy bezpośredniej może być używanie zbyt małych eksplantatów. Cebrat i in. [1990b] proponują używanie do mikrorozmnażania koniczyny czerwonej eksplantatów złożonych z wierzchołka pędu, odcinka hipokotyla i liścieni. W ich badaniach takie eksplantaty wytwarzały najwięcej pędów. W badaniach Phillips, Collins [1979] etap indukcji przeżywało 80% eksplantatów złożonych z merystemu wierzchołkowego i dwu primordiów i 65% zawierających jeden zawiązek liścia. Mniejsze eksplantaty dawały jednak więcej pędów (roślin) wolnych od wirusów.

Tabela 1. Etap indukcji  
Table 1. Induction stage

Pożywka indukcyjna Induction medium			'Kometa'		'Tula'		'Radius'	
Numer Num- ber	BAP mg	NAA mg	Wartość Value °	V %	Wartość Value °	V %	Wartość Value °	V %
1	0	0,0	3,95	28,4	3,75	30,3	3,51	31,9
2	4	0,0	3,60	38,4	3,55	32,6	3,15	38,3
3	0	0,4	3,65	32,0	2,91	37,3	3,10	31,2
4	2	0,2	4,40	15,3	4,76	12,4	4,35	18,7
5	2	0,4	4,06	29,6	3,51	35,1	3,91	30,3
6	2	0,6	4,00	31,5	4,25	34,4	3,68	37,0
7	4	0,2	3,45	29,8	3,41	33,0	3,75	35,0
8	4	0,4	3,75	35,2	3,65	34,5	3,40	38,2
9	4	0,6	3,25	27,3	3,43	24,5	4,05	27,9
10	6	0,2	3,21	24,1	3,33	26,2	3,98	28,4
11	6	0,4	3,30	22,0	3,18	19,9	3,68	22,2
12	6	0,6	3,35	24,4	3,16	26,0	3,98	25,8
Średnio Mean			3,67	-	3,57	-	3,71	-
NIR <sub>0,05</sub> LSD <sub>0,05</sub>			0,27	-	0,30	-	0,38	-
			0,33					

V – współczynnik zmienności variability coefficient

W naszych badaniach eksplantaty składały się z pąków wierzchołkowych i odcinków hipokotyli. W czasie indukcji zamierały nieliczne eksplantaty (mniej niż 0,5%), było to związane z porażeniem grzybami. Na tym etapie badań nie występowały istotne różnice w zachowaniu się odmian lucerny (tab. 1). W czasie indukcji zachodzącej w ciemności eksplantaty straciły zielone zabarwienie. Wierzchołki pędów umieszczone na pożywkach zawierających auksynę wytwarzały w miejscach odcięcia od hipokotyli grudki bezbarwnego kalusa. Eksplantaty indukowane na pożywkach bez cytokininy rozwijały pojedyncze pędy i zaczęły wytwarzać korzenie. Na pożywkach zawierających ten hormon obok pędu głównego zaczęły rozwijać się pędy boczne. Pędy rozwijające się na pożywkach bez auksyny były cieńsze i dłuższe od powstających w obecności tego hormonu. Na pożywce bez hormonów tworzyły się nieliczne cienkie i długie korzenie, na pożywce z NAA bez cytokininy rozwijało się więcej korzeni, ale były one krótsze i grubsze. Przy ocenie zaawansowania organogenezy po 2 tyg. indukcji najwyżej punktowano genotypy wytwarzające dłuższe pędy oraz z większą liczbą pędów bocznych. U wszystkich odmian najwyższą średnią ocenę uzyskały eksplantaty indukowane przy 2 mg l<sup>-1</sup> BAP i 0,2 mg l<sup>-1</sup> NAA. Obserwowano dużą zmienność wewnątrzodmianową (tab. 1). Współczynniki zmienności były zdecydowanie niższe na pożywce z najniższym poziomem obu hormonów (12,4–18,7%) niż na innych pożywkach (19,9–38,4%).

Tabela 2. Etap regeneracji pędów  
Table 2. Shoots regeneration stage

Pożywka Nr Medium No.	Pierwszy termin odcinania pędów First time-limit of shoots separation						Drugi termin odcinania pędów Second time-limit of shoots separation						Liczba pędów ogółem Total number of shoots		
	'Kometa'		'Tula'		'Radius'		'Kometa'		'Tula'		'Radius'		'Kome- ta'	'Tula'	'Radius'
	Liczba pędów Number of shoots	Wartość Value °	Liczba pędów Number of shoots	Wartość Value °	Liczba pędów Number of shoots	Wartość Value °	Eksplantaty z pędami Explants developing shoots %	Liczba pędów Number of shoots	Eksplantaty z pędami Explants developing shoots %	Liczba pędów Number of shoots	Eksplantaty z pędami Explants developing shoots %	Liczba pędów Number of shoots			
1	1,33	2,87	1,08	3,02	1,00	2,96	0	0	0	0	0	0	1,33	1,08	1,00
2	1,81	3,25	1,86	2,96	1,11	2,95	0	0	0	0	0	0	1,81	1,86	1,11
3	1,39	3,16	1,14	3,08	1,41	3,25	7,5	0,07	15,0	1,15	10,0	0,10	1,46	1,30	1,50
4	2,95	3,06	3,02	2,93	2,94	3,03	90,0	1,30	87,5	1,36	92,5	1,32	4,25	4,38	4,26
5	3,16	3,21	3,27	2,66	3,12	3,21	80,0	1,26	75,0	1,18	87,5	1,23	4,42	4,45	4,35
6	2,83	3,35	2,71	3,21	2,97	3,31	80,0	1,48	80,0	1,65	87,3	1,30	4,31	4,38	4,27
7	2,46	3,03	2,50	2,85	2,69	3,00	92,5	1,47	85,0	1,48	72,5	1,46	3,93	3,98	4,15
8	3,01	3,08	3,09	3,20	2,72	3,26	87,5	1,32	90,0	1,30	85,0	1,54	4,33	4,39	4,26
9	2,67	3,00	2,70	3,16	3,06	3,23	90,0	1,25	85,3	1,16	85,0	1,08	3,92	3,86	4,14
10	2,38	3,01	2,29	2,93	2,47	3,03	72,5	1,08	72,3	1,21	67,5	1,02	3,46	3,50	3,49
11	2,42	2,81	2,16	2,63	2,44	2,73	67,5	1,21	57,5	1,03	62,5	1,11	3,63	3,19	3,55
12	2,42	2,92	2,24	2,77	2,41	2,86	65,0	1,00	60,0	0,98	57,5	0,85	3,42	3,22	3,26
Średnio Mean	2,40	3,06	2,34	2,95	2,36	3,07	-	0,95	-	1,04	-	0,92	3,36	3,30	3,28
NIR <sub>0,05</sub> LSD <sub>0,05</sub>	0,52	ns	0,46	ns	0,44	ns	-	0,67	-	0,72	-	0,59	0,46	0,51	0,42

ns – różnica nieistotna non significant difference

Z badań wykonywanych na *Medicago sativa* L. wynika, że w tym gatunku występuje duża zmienność genetyczna pod względem zdolności do wytwarzania kalusa i organogenezy [Bingham i in. 1975; Wan i in. 1988; Kielly, Bowley 1992]. W uprawie dominują populacyjne odmiany lucerny, zmienność wewnątrzodmianowa jest związana z utrzymywaniem się heterozygotyczności roślin [Staszewski 1975]. Pąk wierzchołkowy składa się z merystemu wierzchołkowego, dwu lub trzech zawiązków liści (primordia) i kilku pąków bocznych umiejscowionych w kątach liści. Rozwój jednego pędu na pożywkach bez cytokininy lub przy przewodzie auksyny jest wynikiem dominacji wierzchołkowej. Wierzchołek pędu wytwarza auksyny, które przemieszczają się w kierunku korzeni i hamują rozwój pędów bocznych [Kopcewicz 2002]. Ten mechanizm można zniwelować wprowadzając do pożywki cytokininę. Murashige [1974] zalecał stosowanie wysokiego stężenia ( $30 \text{ mg l}^{-1}$ ) 2-izopentyloadeniny (2iP), przy małych dawkach ( $0,001 \text{ mg l}^{-1}$ ) kwasu 3-indolilooctowego (IAA). Obecnie w pracach wykonywanych na różnych roślinach wykorzystuje się oprócz 2iP inne cytokininy, najczęściej BAP, która ma silniejsze działanie [Rybczyński, Podyma 1993; Nawracała i in. 1997; Ozgen i in. 1997]. Organogeneza rozpoczyna się na pożywce indukcyjnej, a ulega przyspieszeniu po przeniesieniu eksplantatów na nową pożywkę (regeneracyjną). Może ona mieć ten sam skład co pożywka używana wcześniej [Skucińska, Miszke 1980; Cebrat i in. 1990b], ale używa się też pożywek o zmienionej zawartości hormonów [Nawracała i in. 1997; Doliński 2004].

W naszych badaniach pożywka regeneracyjna cechowała się niskim poziomem hormonów przy dużej przewodzie cytokininy nad auksyną ( $0,4 \text{ mg BAP}$  i  $0,04 \text{ mg NAA}$ ). Już po paru dniach eksplantaty umieszczone na półkach pokoju hodowlanego zaczęły nabierać zielonego zabarwienia. Po tygodniu zaczęły się pojawiać nowe liście. Bezbarwne struktury kalusa, rozwinięte wcześniej u podstawy pędów przyjęły zabarwienie jasnobrązowe. Pierwszy raz odcinano pędy od eksplantatów pierwotnych po 4 tygodniach regeneracji, gdyż wcześniej (po 3 tyg.) obserwowano na wielu pędach żółknięcie starszych liści. Odcinano pędy posiadające co najmniej dwa dobrze wykształcone liście.

O zjawisku zamierania starszych liści pod koniec regeneracji pędów nie wspominają autorzy badań wykonanych na lucernie [Nemcova i in. 1987], soi [Nawracała i in. 1997], łubinie [Rybczyński, Podyma 1993] i koniczynie [Cebrat i in. 1990b; Doliński 2004]. Podręczniki z biotechnologii podają, że po 3–4 tygodniach kultur *in vitro* obniża się pH pożywki do 5,0, a nawet 4,5 i w tym czasie należy przenieść eksplantaty na świeżą pożywkę w celu zachowania warunków kultury [Bach 2001]. Obserwowane zjawisko mogło być związane z silną reakcją badanych odmian lucerny na postępujące zakwaszanie pożywki. Staszewski [1975] i Wilczek [1999] podają, że *Medicago sativa* L. do dobrego rozwoju wymaga gleb o pH zbliżonym do 6,0.

Tabela 3. Etap ukorzenia pędów  
Table 3. Shoots rooting stage

Pożywka Nr Medium No.	% ukorzenionych pędów % of shoots with roots			Pędy z korzeniami – ocena Shoots with roots – estimation °			Pędy bez korzeni – ocena Shoots without roots – estimation °		
	'Kometata'	'Tula'	'Radius'	'Kometata'	'Tula'	'Radius'	'Kometata'	'Tula'	'Radius'
1	28,3	25,6	25,0	2,63	2,86	2,55	1,00	1,71	1,00
2	31,9	33,8	29,5	3,23	3,00	3,08	1,91	1,92	1,00
3	55,2	56,9	61,7	2,78	2,93	3,05	1,00	2,16	1,76
4	58,8	65,2	57,6	3,08	2,78	2,75	1,00	1,00	1,00
5	62,7	67,4	71,3	3,33	3,70	3,58	2,08	1,76	1,71
6	52,3	55,4	50,9	2,72	2,63	2,86	1,00	1,00	1,00
7	66,8	67,9	68,7	3,05	2,93	2,96	1,00	1,00	1,71
8	51,4	48,3	55,3	2,83	2,72	3,05	1,00	1,00	1,00
9	49,6	51,3	51,8	2,78	3,11	3,16	1,00	1,00	1,00
10	52,5	45,0	47,6	3,33	3,33	3,23	1,00	1,71	1,00
11	60,0	63,3	65,5	3,66	3,80	3,83	1,00	1,00	1,00
12	46,0	43,4	49,1	3,70	3,58	3,33	1,00	1,00	1,00
Średnio Mean	51,3	51,9	52,8	3,10	3,11	3,11	1,16	1,35	1,18
NIR <sub>0,05</sub>	-	-	-	0,43	0,50	0,47	ns	ns	ns
LSD <sub>0,05</sub>	-	-	-	0,47			ns		

ns – różnica nieistotna non significant difference

Średnia liczba regenerowanych pędów zależała głównie od składu wcześniej stosowanych pożywek indukcyjnych, nie stwierdziliśmy istotnych różnic między odmianami (tab. 2). Eksplantaty indukowane na pożywkach kontrolnych wytwarzały istotnie mniej pędów niż przy obecności obu hormonów w różnych proporcjach. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozwoju pędów odcinanych z eksplantatów indukowanych na różnych pożywkach (tab. 2). W czasie drugiego cyklu regeneracji eksplantaty indukowane na pożywkach bez hormonów i zawierających tylko cytokininę nie wytworzyły nowych pędów. Tylko niektóre eksplantaty indukowane na pożywce z NAA bez BAP wytwarzały pojedyncze pędy (7,5–15,0%). Procentowy udział eksplantatów z pędami był na pozostałych pożywkach większy (57,5– 92,5%). Udział eksplantatów z nowymi pędami był mniejszy na pożywkach z najwyższym poziomem cytokininy niż przy niższych stężeniach BAP (tab. 2). Średnia liczba pędów zregenerowanych w czasie ośmiu tygodni była istotnie mniejsza w grupach eksplantatów indukowanych na pożywkach kontrolnych niż na zawierających oba hormony. Najwięcej pędów (4,25–4,45) wytwarzały eksplantaty indukowane przy najniższym poziomie cytokininy oraz na pożywce z 4 mg BAP i 0,04 mg NAA (4,26–4,39). Na

wszystkich pożywkach z BAP i NAA obserwowano dużą zmienność wewnątrzodmianową, obok eksplantatów z pojedynczymi pędami występowały genotypy wytwarzające nawet 8–11 pędów.

Przedstawione wyniki były zbliżone do otrzymanych przez innych autorów, którzy wykorzystywali wierzchołki pędów do mikrorozmnażania różnych roślin z rodziny *Papilionaceae*. Nemcova i in. [1987] stwierdzili duże różnice w zdolności klonów lucerny siewnej do regeneracji pędów z pąków wierzchołkowych. Na pożywce B<sub>5</sub> z 2 mg BAP i 0,1 mg NAA jeden genotyp wytwarzał w czasie sześciu tygodni 20 pędów z eksplantatu, a drugi nie wykazywał zdolności do mikrorozmnażania. W badaniach wykonanych przez Ozgen i in. [1997] dwie odmiany *Medicago sativa* L. regenerowały najwięcej pędów po indukcji na pożywce zawierającej 2 mg l<sup>-1</sup> BAP i 0,2 mg l<sup>-1</sup> NAA. Przy indukcji na pożywkach z mniejszą i większą zawartością cytokininy liczba pędów malała. W badaniach wykonanych na soi [Nawracała i in. 1997] liczba pędów otrzymanych w trzech cyklach regeneracji (3 x 4 tyg.) zależała od odmiany i składu pożywki indukcyjnej. Najwyższą średnią efektywność regeneracji (3,4) wykazały osie zarodkowe niedojrzałych nasion, indukowane na pożywce z 3 mg l<sup>-1</sup> BAP i 0,4 mg l<sup>-1</sup> NAA. Esparceta siewna na pożywce B<sub>5</sub> zawierającej BAP (0,05 mg l<sup>-1</sup>) wytwarzała w czasie sześciu tyg. ze średniego pąka wierzchołkowego 6,6 pędów, a bez cytokininy tylko 0,53 [Tomes 1979]. W pracach zmierzających do otrzymania roślin wolnych od wirusów wykorzystywane są mniejsze eksplantaty (0,2–0,4 mm) i pożywki z małą zawartością cytokininy, na których rozwijają się pojedyncze pędy [Phillips, Collins 1979].

Ukorzenianie jest etapem mikrorozmnażania, w którym pędy odcięte od eksplantatów wytwarzają korzenie i w ten sposób przekształcają się w rośliny. Do ukorzeniania pędów roślin motylkowych najczęściej używa się pożywek podstawowych (MS i B<sub>5</sub>) bez regulatorów wzrostu, o normalnej zawartości makro- i mikroelementów albo półstężonych [Bingham i in. 1975; Rybczyński, Podyma 1993; Nawracała i in. 1997; Tomes 1979; Doliński 2004]. W literaturze można też znaleźć prace, w których używano pożywek wzbogaconych auksynami [Phillips, Collins 1979; Nemcova i in. 1987; Broda, Torz 1997; Ozgen i in. 1997].

W naszych badaniach pędy były ukorzeniane na pół stężonej pożywce MS bez hormonów. Pierwsze korzenie pojawiły się po siedmiu dniach kultury. Średni procent ukorzenionych pędów wyliczony dla całego doświadczenia wynosił 52,0 (tab. 3). Wolniej ukorzeniały się pędy odcinane od eksplantatów indukowanych na pożywce bez hormonów oraz zawierającej cytokininę bez auksyny (25,0–33,8%). Szybciej tworzyły korzenie pędy z eksplantatów indukowanych na pożywkach z auksyną (43,4–68,7%). Na koniec tego etapu badań pędy z korzeniami były lepiej rozwinięte od nieukorzenionych (były grubsze i dłuższe, miały więcej liści). Średni stopień zaawansowania rozwoju pędów ukorzenio-



nych oceniono na 3,11 a pędów bez korzeni na 1,23. Młode rośliny trzech odmian lucerny łatwo przechodziły proces hartowania, dobrze znosiły stopniowe obniżanie wilgotności powietrza i zmiany temperatury i nie zamierały po wysadzeniu do nieodkazanej gleby.

W licznych badaniach wykonanych na lucernie i innych roślinach motylkowatych występowały duże różnice w zdolności do ryzogenezy. W badaniach wcześniejszych różne genotypy lucerny siewnej różniły się zdolnością tworzenia korzeni przez sadzonki zielne umieszczane w wilgotnej glebie lub piasku [Melton 1969; Hill, Jr 1976]. Oelck i Schieder [1983] wykazali, że u tej rośliny zdolność do wytwarzania korzeni jest skorelowana ze zdolnością do somatycznej embriogenezy. Intensywna selekcja w kierunku dobrego ukorzenia pędów w warunkach *in vitro* prowadziła do otrzymania klonów lucerny o podwyższonej zdolności wytwarzania kalusa i somatycznej embriogenezy. Dużą zdolność do ryzogenezy obserwowano w badaniach wykonanych na koniczynie. W badaniach Phillips i Collins [1979] na półstężonej pożywce L2 zawierającej  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  IAA w ciągu czterech tygodni ukorzeniło się 90% pędów *Trifolium pratense* L. Dobrze ukorzeniały się również pędy tej rośliny (91%) na pozbawionej regulatorów wzrostu pożywce B<sub>5</sub> [Doliński 2004]. W badaniach na *Trifolium repens* L. intensywna ryzogeneza zachodząca w kulturach kalusa utrudniała identyfikację genotypów zdolnych do mikrorozmnażania na drodze somatycznej embriogenezy lub organogenezy [Gresshoff 1980]. W badaniach na *Lotus corniculatus* L. [Tomes 1979] na pożywce B<sub>5</sub> bez hormonów w ciągu czterech tygodni wytworzyło korzenie 58% pędów. Rybczyński i Podyma [1993] wykazali w badaniach wykonanych na pięciu gatunkach łubinu, że duży wpływ na proces ryzogenezy może mieć czynnik zestalający pożywkę. Badane gatunki różniły się zdolnością do ukorzenia pędów, u większości z nich najwięcej pędów wytworzyło korzenie na pożywce B<sub>5</sub> zestalanej Gelrite (86,6–100%), a najmniej na tej samej pożywce zestalanej agarem (0–26,6%).

#### WNIOSKI

1. Badane odmiany lucerny mieszańcowej wykazały się dużą zdolnością do regeneracji roślin z wierzchołków pędów.

2. Najwięcej pędów otrzymano po indukcji eksplantatów na pożywkach zawierających  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BAP, przy różnych stężeniach NAA. Dobre efekty dawała też pożywka indukcyjna z  $4 \text{ mg l}^{-1}$  BAP i  $0,4 \text{ mg l}^{-1}$  NAA.

3. Nie stwierdzono istotnych różnic w zachowaniu odmian lucerny na kolejnych etapach mikrorozmnażania. Obserwowano natomiast dużą zmienność wewnątrzodmianową. Różnice genetyczne dotyczyły zdolności do indukcji orga-

nogenezy (otrzymywano od 1 do 11 pędów z eksplantatu) i szybkości wytwarzania korzeni na pożywce ukorzeniającej (52 % genotypów wytwarzało korzenie w czasie czterech tygodni).

4. Mikrorozmnażanie wykorzystujące wierzchołki pędów może być w hodowli lucerny wykorzystywane do szybkiego namnażania wartościowych materiałów (np. nieliczne nasiona – genotypy otrzymane przy krzyżowaniach oddalonych i chowie wsobnym, komponenty odmian heterozyjnych i syntetycznych).

#### PIŚMIENNICTWO

- Bach A. 2001. Rozmnażanie wegetatywne. W: Biotechnologia Roślin. Red. S. Malepszy. PWN, Warszawa.
- Bingham E.T., Hurley L.V., Katz D.M., Saunders J.W. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15, 719–721.
- Broda Z., Torz L. 1997. Zdolności regeneracyjne lucerny mieszańcowej (*Medicago media* Pers) poprzez somatyczną embriogenezę. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, 318, 235–238.
- Cebat J., Kruczkowska H., Miszke W., Pawłowska H., Skucińska B. 1990a. *In vitro* organogenesis from seedling explants of red clover (*Trifolium pratense* L.) and fodder beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *crassa* Alef.) *Acta Biol. Crac., Ser. Bot.* 32, 223–333.
- Cebat J., Kruczkowska H., Miszke W., Pawłowska H., Skucińska B. 1990b. Micropropagation of red clover (*Trifolium pratense* L.) from flower heads. *Acta Biol. Crac., Ser. Bot.* 32, 235–242.
- Doliński R. 2004. Ocena polskich odmian koniczyny czerwonej pod względem zdolności do somatycznej embriogenezy. *Biotechnologia* 2 (65), 123–130.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12, 473–478.
- Gresshoff P.M. 1980. *In vitro* culture of white clover: callus, suspension, protoplast culture and plant regeneration. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 141, 2, 157–164.
- Hauptvogel P., Farago J., Bojanska K., Kraiç J. 1998. Variability of regenerated alfalfa plants. Report of the Thirty-sixth North American Alfalfa Improvement Conference. August 2–6, 1998, Bozeman, Montana, p. 58.
- Hill R. R., Jr. 1976. Response to inbreeding in alfalfa populations derived from single clones. *Crop Sci.* 16, 237–241.
- Kielly G.A., Bowley S.R. 1992. Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* 35, 474–477.
- Kopcewicz J. 2002. Rozwój wegetatywny. [W:] *Fizjologia Roślin*. Red. J. Kopcewicz i S. Lewak. PWN, Warszawa.
- Melton B. 1969. Comparative seed and forage yield in crosses of selected alfalfa clones as compared to polycross progeny. *Crop Sci.* 9, 253–255.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 135–166.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Nawracała J., Konieczny G., Ulman S. 1997. Wpływ różnych kombinacji stężenia BA i NAA na regenerację roślin soi z osi zarodkowych niedojrzałych nasion. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, 348, 50, 153–156.

- Nemcova B., Nasinec V., Chloupek O. 1987. Klonovani vojtesky *in vitro*. Rostlinna Vyroba 33, 1207–1213.
- Oelck M.M., Schieder O. 1983. Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. Z. Pflanzenzuchtg 91, 312–321.
- Ozgen M., Altinok S., Ozcan S., Sevimay C.S. 1997. In vitro micropropagation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. Abstract. Turkish J. Bot. 21, 5, 275–278.
- Phillips G.C., Collins G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19, 59–64.
- Rybczyński J.J., Podyma E. 1993. Micropropagation of some *Lupinus* species from seedling explants. Genetica Polonica 34, 3, 237–247.
- Skucińska B., Miszke W. 1980. *In vitro* vegetative propagation of red clover. Z. Pflanzenzuchtg 85, 328–331.
- Staszewski Z. 1975. Lucerny. PWRiL, Warszawa.
- Tomes D.T. 1979. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes. Can. J. Bot. 57, 137–140.
- Wan Y., Sorensen E.L., Liang G.H. 1988. Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Euphytica 39, 3–9.
- Wilczek M. 1999. Lucerna mieszańcowa i siewna. [W:] Szczegółowa uprawa roślin. Tom 2. Red. Z. Jasińska, A. Kotecki. Wrocław.
- Yang D.C., Choi Y.E. 2000. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 19, 491–496.