

AKTYWNOŚĆ METABOLICZNA JAKO POTENCJALNY WSKAŹNIK ZDOLNOŚCI DO RÓŻNICOWANIA W KULTURACH KALUSA RZEPAKU – WPŁYW EGZOGENNEJ SPERMIDYNY

Iwona Żur¹, Janusz Kościelniak², Franciszek Dubert¹

¹ Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie

² Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wstęp

Uzyskanie tkanki kalusowej o wysokim potencjale morfogenetycznym jest bardzo istotne z punktu widzenia hodowli *in vitro* i biotechnologii. Wczesna identyfikacja tkanek o dużych zdolnościach regeneracyjnych mogłaby znacznie skrócić czas oraz nakłady kosztów i pracy badawczej. Jednakże ze względu na swoją złożoność proces regeneracji jest wciąż słabo poznany na poziomie biochemicznym i generalnie wciąż nie są znane cechy charakteryzujące tkankę zdolną do regeneracji.

W wielu przypadkach hodowli *in vitro* stres (chłód, wysoka temperatura, głód pokarmowy, stres osmotyczny lub oksydacyjny) okazał się być czynnikiem indukującym organogenezę [KAVI KISHOR, REDDY 1986; COLL i in. 1998] lub embriogenezę somatyczną tkanki kalusowej [CAILLOUX i in. 1996; FIND 1997; KAITONG i in. 1999], androgenezę izolowanych pylników czy mikrospor [TOURAEV i in. 1997; INDRIANTO i in. 1999]. Równocześnie jedną z często obserwowanych reakcji na stres jest wzrost zawartości poliamin (Pas) i aktywności enzymów katalizujących syntezę tych związków [EVANS, MALMBERG 1989; BOUCHEREAU i in. 1999]. Również bezpośredni udział Pas w embriogenezie somatycznej i organogenezie został stwierdzony w wielu przypadkach [CHI i in. 1994; TORNÉ i in. 1994; SABAPATHY, NAIR 1995; YADAV, RAJAM 1997]. Istnieje więc możliwość, iż poliaminy, których synteza może być stymulowana stresem, przynajmniej dla niektórych systemów są czynnikiem niezbędnym dla indukcji morfogenezy.

Badano, czy egzogenicznie podana poliamina może stymulować proces różnicowania tkanki kalusowej rzepaku (*Brassica napus* var. *oleifera* L.). Równocześnie podjęto próbę stwierdzenia, czy aktywność metaboliczna mierzona intensywnością oddychania, wydzielania ciepła i szybkością wzrostu tkanki kalusowej może stanowić dogodny wskaźnik w selekcji tkanek zdolnych do regeneracji.

Materiał i metody

Badaniom podano dwie odmiany rzepaku (odm. ozimą Górczański i odm. jarą Spok) wybrane na podstawie wcześniejszych badań własnych [ŻUR 1997] jako istotnie zróżnicowane pod względem szybkości wzrostu, żywotności i zdolności do różnicowania pędów w kulturach *in vitro*. Podobnie, na podstawie wcześniejszych

badani własnych [ŻUR i in. 2000], wybrano rodzaj poliaminy – spermidynę (Spd) i jej stężenie – $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, jako najbardziej obiecujące pod względem zdolności do inicjowania różnicowania tkanki kalusowej.

Tkanek kalusową indukowano na fragmentach hypokotyli 5-dniowych siewek, izolowanych i przenoszonych na pożywkę MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] z dodatkiem benzyloadeniny $1 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego $0,5 \text{ mg 2,4-D} \cdot \text{dm}^{-3}$ i 6% sacharozy (pożywka indukcyjna MS1). Kultury hodowano w 25°C i przy 16 h/8 h (dzień/noc) fotoperiodzie. Po 2 tygodniach hodowli kalus izolowano i przenoszono na pożywkę stymulującą różnicowanie: MS z dodatkiem $3 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, kwasu giberelinowego $0,1 \text{ mg GA}_3 \cdot \text{dm}^{-3}$ i 3% sacharozy (pożywka regeneracyjna MS2). W trakcie hodowli pożywki (indukcyjną, regeneracyjną lub obie – tab. 1) wzbogacano dodatkiem $0,3 \text{ mmol Spd} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tabela 1; Table 1

Schemat doświadczenia
Scheme of the experiment

Faza hodowli; Culture phase	Pożywka hodowlana; Culture medium			
Indukcja kalusa; Callus induction	MS1		MS1 + $0,3 \text{ mmol Spd} \cdot \text{dm}^{-3}$	
Różnicowanie kalusa Callus differentiation	MS2	MS2 + $0,3 \text{ mmol Spd} \cdot \text{dm}^{-3}$	MS2	MS2 + $0,3 \text{ mmol Spd} \cdot \text{dm}^{-3}$

MS1 – pożywka indukcyjna (pożywka Murashige-Skoog z dodatkiem benzyloadeniny – $1 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego – $0,5 \text{ mg 2,4-D} \cdot \text{dm}^{-3}$ i 6% sacharozy); induction medium (Murashige-Skoog medium with supplement of 6-benzylaminopurine – $1 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – $0,5 \text{ mg 2,4-D} \cdot \text{dm}^{-3}$ and 6% sucrose)

MS2 – pożywka regeneracyjna (pożywka Murashige-Skoog z dodatkiem benzyloadeniny – $3 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, kwasu giberelinowego – $0,1 \text{ mg GA}_3 \cdot \text{dm}^{-3}$ i 3% sacharozy); regeneration medium (Murashige-Skoog medium with supplement of 6-benzylaminopurine – $3 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, gibberellic acid – $0,1 \text{ mg GA}_3 \cdot \text{dm}^{-3}$ and 3% sucrose)

Spd – spermidyna; spermidine

Kultury pasażowano w odstępach dwutygodniowych z równoczesnym pomiarem świeżej masy tkanki oraz pomiarami intensywności oddychania (w temp. 25°C , w systemie otwartym za pomocą analizatora CO_2 w podczernieni LCA-2, The Analytical Development Co., Hoddesdon) i wydzielania ciepła (pomiarzy za pomocą mikrokalorymetru izotermicznego BioActivity Monitor 2277, LKB). Pomiarzy wykonywano na kalusach o możliwie jednolitej strukturze, morfologii i zbliżonej masie.

Pod koniec 6-tygodniowego okresu hodowli dokonano wizualnej oceny stopnia zróżnicowania i żywotności tkanki kalusowej.

Wyniki i dyskusja

Podobnie jak we wcześniejszych pracach [ŻUR 1997; ŻUR i in. 2000] obserwowano istotne genotypowe zróżnicowanie reakcji na zastosowane warunki hodowli *in vitro*, pomiędzy dwoma wybranymi do badań odmianami rzepaku. Odmiana jara Spok charakteryzowała się wprawdzie wolnym tempem indukcji tkanki kalusowej (średnia masa kalusa po 2 tygodniach hodowli na MS1 wynosiła $18,5 \text{ mg}$), ale następczo szybkim względnym przyrostem masy po przeniesieniu kalusów na pożywkę regeneracyjną (tab. 2) oraz dużą zdolnością regeneracyjną – średnio 43% kalusów regenerowało pędy (rys. 1). Odmianę ozimą Górczańską charakteryzowała zdolność do szybkiej indukcji tkanki kalusowej (śr. masa kalusa

po 2 tyg. hodowli wynosiła 53 mg), jednakże wolne namnażanie kalusa na pożywce MS2 (tab. 2) i praktyczny brak zdolności regeneracyjnej (rys. 1). Tego typu genomowe uwarunkowanie reakcji jest zjawiskiem znanym i często notowanym zarówno w obrębie całego rodzaju *Brassica*, jak i w obrębie gatunku *B. napus* [HUI, ZEE 1978; JULLIARD i in. 1992; KHEHRA, MATHIAS 1992; ONO i in. 1994].

Tabela 2; Table 2

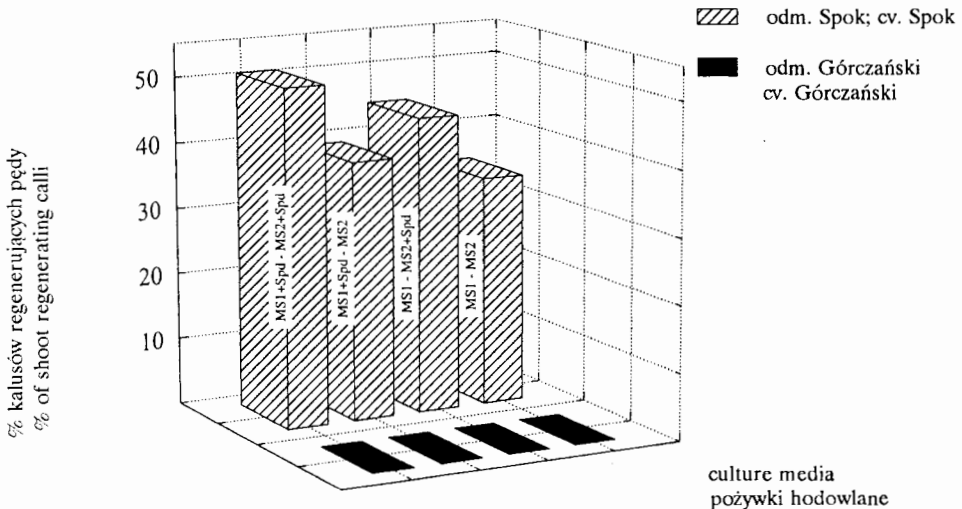
Wpływ spermidyny (Spd) na względny przyrost masy w kulturach kalusa dwóch odmian rzepaku (dane są średnią dla 5 powtórzeń)
Effect of spermidine (Spd) on tissue relative mass growth in callus cultures of two *Brassica napus* cultivars (results are means for 5 replicates)

Odmiana Cultivar	Pożywka indukcyjna Induction medium	Pożywka regeneracyjna Regeneration medium	Względny przyrost masy kalusa* Callus relative mass growth*	
			po 2 tyg. hodowli na pożywce MS2; after 2-week culture on MS2 medium	po 4 tyg. hodowli na pożywce MS2; after 4-week culture on MS2 medium
Górczański	MS1	MS2	3,9 ab	0,9 a
		MS2 + Spd	3,5 a	0,9 a
	MS1 + Spd	MS2	4,8 b	1,0 a
		MS2 + Spd	4,4 ab	1,0 a
Spok	MS1	MS2	8,4 d	2,4 c
		MS2 + Spd	7,7 cd	1,8 b
	MS1 + Spd	MS2	7,0 c	2,9 d
		MS2 + Spd	7,2 cd	2,6 cd

* (świeża masa końcowa – świeża masa początkowa)/świeża masa początkowa; (final fresh weight – initial fresh weight)/initial fresh weight

Analiza statystyczna (NIR) odrębna dla poszczególnych kolumn. Średnie oznaczone tymi samymi literami nie są istotnie różne przy $p < 0,05$; Statistical analyses (LSD) separate for each column. Data followed by the same letter are not significantly different at the $p < 0.05$ level

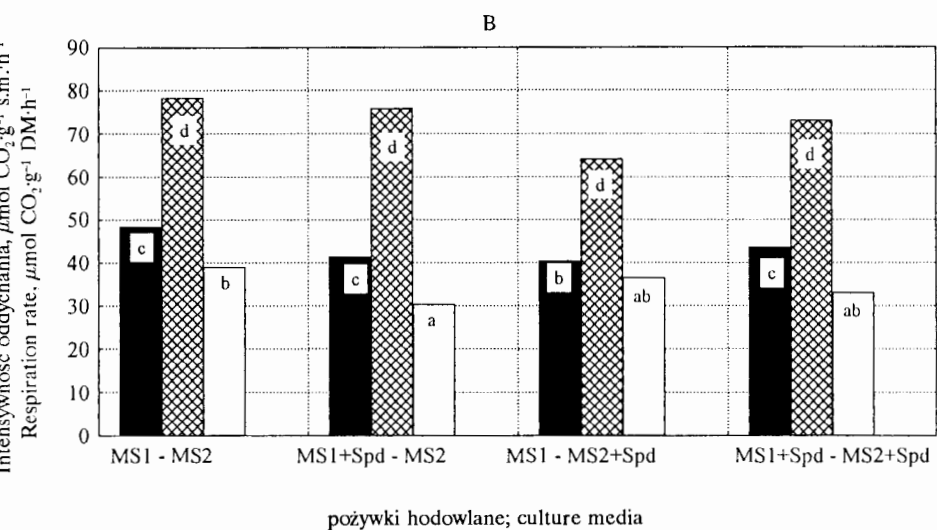
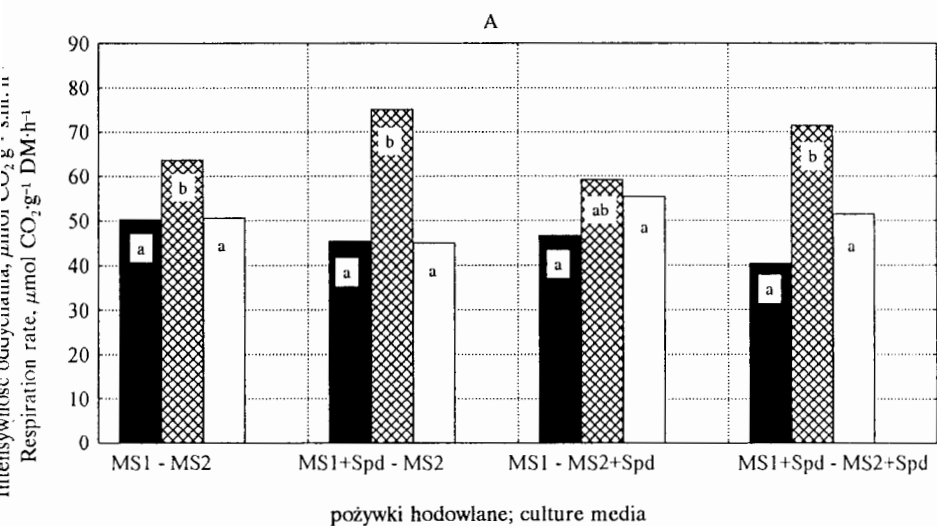
MS1, MS2, Spd – oznaczenia jak w tab. 1; explanations see Tab. 1



MS1, MS2, Spd – oznaczenia jak w tab. 1; explanations see Tab. 1

Rys. 1. Regeneracja pędów w kulturach kalusa dwóch odmian rzepaku (*Brassica napus* L.) traktowanych egzogenną spermidyną

Fig. 1. Regeneration of shoots in callus cultures of two rape cultivars (*Brassica napus* L.) treated with exogenous spermidine

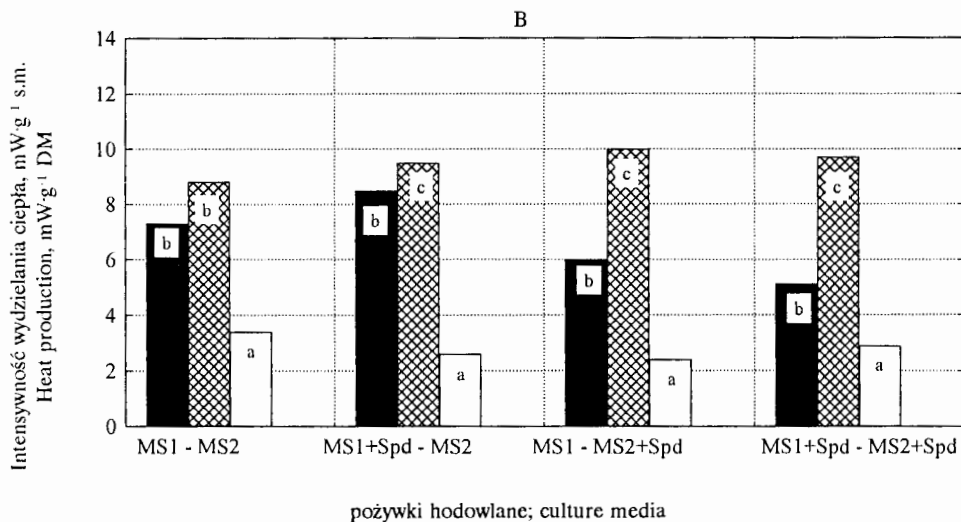
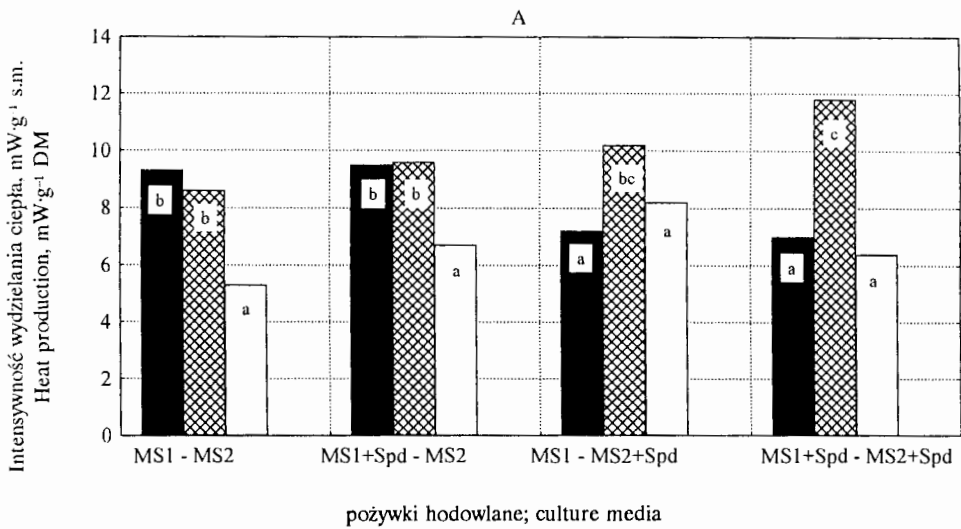


- odm. Spok, kalusy nieregenerujące; cv. Spok, non-regenerating calli
- odm. Spok, kalusy regenerujące; cv. Spok, regenerating calli
- odm. Górczański, kalusy nieregenerujące; cv. Górczański, non-regenerating calli

Śłupki oznaczone jednakowymi literami nie różnią się istotnie (test NIR, $p < 0.05$); Columns marked with the same letter do not differ significantly (LSD test, $p < 0.05$)

Rys. 2. Intensywność oddychania ($\mu\text{mol CO}_2 \text{g}^{-1} \text{s.m. h}^{-1}$) tkanki kalusowej dwóch odmian rzepaku (*Brassica napus* L.) traktowanych egzogenną spermidyną: po 2 tygodniach hodowli na pożywce regeneracyjnej (A) i po 4 tygodniach hodowli na pożywce regeneracyjnej (B)

Fig. 2. Respiration rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{g}^{-1} \text{DM h}^{-1}$) of callus tissue of two rape (*Brassica napus* L.) cultivars treated with exogenous spermidine: after 2-week culture on regeneration medium (A) and after 4-week culture on regeneration medium (B)



- odm. Spok, kalusy nieregenerujące; cv. Spok, non-regenerating calli
- odm. Spok, kalusy regenerujące; cv. Spok, regenerating calli
- odm. Górczański, kalusy nieregenerujące; cv. Górczański, non-regenerating calli

Śłupki oznaczone jednakowymi literami nie różnią się istotnie (test NIR, $p < 0,05$); Columns marked with the same letter do not differ significantly (LSD test, $p < 0,05$)

Rys. 3. Intensywność wydzielania ciepła ($mW \cdot g^{-1} s.m.$) z tkanki kalusowej dwóch odmian rzepaku (*Brassica napus* L.) traktowanych egzogenną spermidyną: po 2 tygodniach hodowli na pożywce regeneracyjnej (A) i po 4 tygodniach hodowli na pożywce regeneracyjnej (B)

Fig. 3. Heat production rate ($mW \cdot g^{-1} DM$) by callus tissue of two rape (*Brassica napus* L.) cultivars treated with exogenous spermidine: after 2-week culture on regeneration medium (A) and after 4-week culture on regeneration medium (B)

Młoda, nieróżnicująca się tkanka kalusowa charakteryzowała się podobną aktywnością metaboliczną zarówno pod względem intensywności oddychania, jak i wydzielania ciepła, bez względu na cechy genomowe (rys. 2A, 3A). Następcze 2 tygodnie hodowli spowodowały pojawienie się istotnych różnic pomiędzy odmianami, wywołanych spadkiem intensywności oddychania i wydzielania ciepła u odmiany ozimej (rys. 3). Spadek ten był prawdopodobnie wynikiem obniżenia żywotności tkanki (tab. 3), o którym świadczyło wolniejsze tempo wzrostu i obserwowane zmiany morfologiczne (brązowienie tkanki, rozluźnienie struktury). Równocześnie w tkance kalusowej, w której obserwowano pierwsze zmiany strukturalne świadczące o różnicowaniu, zanotowano istotny wzrost aktywności metabolicznej (rys. 2, 3). Potwierdzają to doniesienia innych autorów [BROWN, THORPE 1986] oraz obserwacje własne [ŻUR 1997] świadczące o wysokiej energochłonności procesu morfogenezy i towarzyszącej mu aktywacji metabolizmu komórkowego.

Tabela 3; Table 3

Żywotność tkanek kalusowych dwóch odmian rzepaku
po 4 tygodniach hodowli na pożywkach regeneracyjnych

Callus viability of two rape cultivars after 4-week culture on regeneration media

Odmiana Cultivar	Pożywka indukcyjna; Induction medium	Pożywka regeneracyjna; Regeneration medium	Żywotność tkanki kalusowej (%) Viability of callus tissue (%)		
			A	B	C
Górczański	MS1	MS2	88	12	0
		MS2 + Spd	62	16	12
	MS1 + Spd	MS2	91	6	3
		MS2 + Spd	59	41	0
Spok	MS1	MS2	100	0	0
		MS2 + Spd	100	0	0
	MS1 + Spd	MS2	100	0	0
		MS2 + Spd	100	0	0

A – w pełni żywotna tkanka kalusowa; fully viable callus tissue

B – tkanka kalusowa o osłabionej żywotności; callus tissue of lower viability

C – nekrotyczna tkanka kalusowa; necrotic callus tissue

MS1, MS2, Spd – oznaczenia jak w tab. 1; explanations see Tab. 1

Nie obserwowano wpływu Spd na żywotność tkanek kalusowych odmiany jarej (tab. 3). U odmiany ozimej natomiast Spd wywoływała widocznie niekorzystny efekt, zwłaszcza jeśli obecna była w pożywce regeneracyjnej, inicjując szybsze starzenie się ok. 40% populacji. Wydaje się, iż wynik ten pozostaje w pewnej sprzeczności z powszechnie znanym zjawiskiem hamowania starzenia się tkanek pod wpływem poliamin. Jednakże istnieją też doniesienia sugerujące brak wpływu Pas na proces starzenia się tkanek, np. w liściach jęczmienia [SRIVASTAVA i in. 1983] lub wręcz odwrotne oddziaływanie: stymulację wydzielania etylenu obserwowaną u goździków pod wpływem egzogennej putrescyny i spermidyny [DOWNS, LOVELL 1986].

Egzogenna Spd bez względu na moment aplikacji nie była czynnikiem zdolnym do inicjacji procesu morfogenezy u odmiany ozimej rzepaku o niskim potencjale morfogenetycznym. Wykazano natomiast stymulację różnicowania kalusów

odmiany jarej. Spd obecna w trakcie całego okresu hodowli podnosiła częstotliwość regeneracji o ok. 15%, dodana tylko do pożywki regeneracyjnej o ok. 10% (rys. 1). Tęgo typu korzystne oddziaływanie zaobserwowano również między innymi w kulturach kalusa *Brassica alboglabra* B. [PUA i in. 1996], *Oryza sativa* L. [BAJAJ, RAJAM 1995] i *Corylus avellana* L. [BERROS i in. 1997]. Prawdopodobnie istotną rolę w zjawiskach tych odgrywa, uwarunkowany genomowo, endogeny poziom poliamin, jednakże ze względu na brak informacji w tym zakresie możemy jedynie spekulować, iż różna reakcja dwóch odmian rzepaku wynikała z różnego endogennego podłoża procesu. Wiadomo również, iż w niektórych przypadkach istotne są nie tyle bezwzględne zawartości poliamin w tkance, ile stosunki stężeń poszczególnych poliamin, a zwłaszcza putrescyna : spermidyna. Spd nie wpłynęła istotnie na tempo wzrostu, oddychania i wydzielania ciepła w tkankach kalusowych odmiany ozimej (rys. 2, 3). W przypadku odmiany jarej nie obserwowano różnic w szybkości wzrostu i intensywności oddychania tkanek hodowanych w obecności lub bez Spd. Reakcja na obecność Spd pod względem ilości energii wydzielanej w formie ciepła zależała natomiast od stopnia zróżnicowania tkanek. Pod wpływem Spd obserwowano spadek produkcji ciepła w tkankach nieróżnicujących i odwrotną reakcję w tkankach różnicujących się. Efekt ten był wyraźnie widoczny w przypadku obiektów, w których Spd wywołała istotną stymulację różnicowania. Świadczy to o spadku efektywności energetycznej metabolizmu komórkowego (wzroście energii wydzielanej w formie nieproduktywnej w stosunku do ilości energii wyprodukowanej) w tkankach inicjujących różnicowanie i jest z reguły charakterystyczne dla organizmów intensywnie rosnących lub też poddanych stresowi [ANEKONDA i in. 1994].

Wnioski

Inicjacji różnicowania towarzyszy wzrost aktywności metabolicznej komórek uwidaczniający się zarówno w intensywności oddychania, jak i wydzielania ciepła. Parametry te potencjalnie mogą stanowić wskaźnik zdolności do różnicowania tkanki kalusowej.

Egzogenne stosowana spermidyna nie jest czynnikiem, który może zainicjować proces regeneracji w tkankach o genomowo zakodowanym niskim potencjale morfogenetycznym. Może jednakże stymulować różnicowanie tkanki o potencjalnie dużych zdolnościach regeneracyjnych.

Literatura

- ANEKONDA T.S., CRIDDLE R.S., LIBBY W.J., BREIDENBACH R.W., HANSEN L.D. 1994. *Respiration rates predict differences in growth of coast redwood*. Plant Cell Environ. 17: 197–203.
- BAJAJ S., RAJAM M.V. 1995. *Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine*. Plant Cell Rep. 14: 717–720.
- BERROS B., ÁLVAREZ C., RODRÍGUEZ R. 1997. *Effect of putrescine-synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut*. Angew. Bot. 71: 90–93.
- BOUCHIEREAU A., AZIZ A., LARHER F., MARTIN-TANGUY J. 1999. *Polyamines and environ-*

mental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103–125.

BROWN C.D., THORPE T. A. 1986. *Plant regeneration by organogenesis*, w: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 3. *Plant regeneration and genetic variability*. Vasil I.K. (wyd.), Academic Press Inc., London: 49–65.

CAILLOUX F., JULIEN-GUERRIER J., LINOSSIERL., COUDRET A. 1996. *Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in Hevea brasiliensis*. *Plant Sci.* 120: 185–196.

CHI G.-L., LIN W.-S., LEE J.E.E., PUA E.-C. 1994. *Role of polyamines on de novo shoot morphogenesis from cotyledons of Brassica campestris ssp. pekinensis (Lour) Olsson in vitro*. *Plant Cell Rep.* 13: 323–329.

COLL Y., PUJOL M., CASTILLO D., GONZÁLEZ A., ALFONSO J., ARMAS R. 1998. *Improvement of Indica rice (Oryza sativa L.) in vitro regeneration efficiency from callus mediated by stress*. *Cereal Research Com.* 26(2): 153–160.

DOWNES C.G., LOVELL P.H. 1986. *The effect of spermidine and putrescine on the senescence of cut carnations*. *Physiol. Plant.* 66: 679–684.

EVANS P.T., MALMBERG R.L. 1989. *Do polyamines have roles in plant development?* *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 235–269.

FIND J.I. 1997. *Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination*. *Plant Sci.* 128: 75–83.

HUI L. H., ZEE S.-Y. 1978. *In vitro plant formation from hypocotyls and cotyledons of leaf-mustard cabbage (Brassica juncea COSS.)*. *Z. Pflanzenphysiol.* 89: 77–80.

INDRIANTO A., HEBERLE-BORS E., TOURAEV A. 1999. *Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores*. *Plant Sci.* 143: 71–79.

JULLIARD J., SOSSOUNTZOV L., HABRICOT Y., PELLETIER G. 1992. *Hormonal requirement and tissue competency for shoot organogenesis in two cultivars of Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 84: 521–530.

KAITONG C., GENSHENG X., XINMIN L., GENGMEI X., YAFU W., 1999. *Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of Lycium barbarum L.* *Plant Sci.* 146: 9–16.

KAVI KISHOR P.B., REDDY G.M. 1996. *Regeneration of plants from long-term cell cultures of Oryza sativa L.* *Plant Cell Rep.* 5: 391–393.

KIEHRA G.S., MATHIAS J.R. 1992. *The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of Brassica napus L.* *J. Exp. Bot.* 43(256): 1413–1418.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.

ONO Y., TAKAHATA Y., KAIZUMA N. 1994. *Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explant of rape seed (Brassica napus L.)*. *Plant Cell Rep.* 14: 13–17.

PUA E.-C., TEO S.-H., LOH C.-S. 1996. *Interactive role of ethylene and polyamines on shoot regenerability of chinese kale (Brassica alboglabra Bailey) in vitro*. *J. Plant Physiol.* 149: 138–148.

SABAPATHY S., NAIR H. 1995. *In vitro propagation of taro with spermine, arginine and ornithine. II. Plantlet regeneration via callus*. *Plant Cell Rep.* 14: 520–524.

SRIVASTAVA S.K., VASHI D.J., NAIK B.I. 1983. *Control of senescence by polyamines and guanidines in young and mature barley leaves*. Phytochem. 22: 2151–2154.

TORNÉ J.M., CLAPAROIS I., MARCÉ M., GUERGUE A.M., SANTOS M.A. 1994. *Influence of pretreatments with inhibitors of putrescine synthesis on polyamine metabolism and differentiation processes of maize calluses*. Plant Sci. 100: 15–22.

TOURAEV A., VICENTE O., HEBERLE-BORS E. 1997. *Initiation of microspore embryogenesis by stress (a review)*. Trends Plant Sci. 2: 285–323.

YADAV J.S., RAJAM M.V. 1997. *Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of Solanum melongena L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine*. J. Exp. Bot. 48: 1537–1545.

ŻUR I. 1997. *Fizjologiczne wskaźniki zdolności tkanki kalusowej rzepaku (Brassica napus L.) do różnicowania*. Praca doktorska, Akademia Rolnicza, Kraków.

ŻUR I., KOŚCIELNIAK J., DUBERT F., PŁĄZEK A. 2000. *Aktywność metaboliczna jako potencjalny wskaźnik zdolności do różnicowania w kulturach kalusa rzepaku – wpływ egzogennych poliamin*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 473: 349–358.

Słowa kluczowe: *Brassica napus* L., intensywność oddychania, poliaminy, potencjał morfogenetyczny, rzepak, spermidyna, wydzielanie ciepła,

Streszczenie

W wielu przypadkach, w hodowli *in vitro*, stres był czynnikiem inicjującym proces morfogenezy. Równocześnie jedną z często obserwowanych reakcji na stres był wzrost zawartości poliamin (Pas). Stwierdzono również bezpośredni udział Pas w embriogenezie somaklonalnej i organogenezie. W eksperymencie badano, czy egzogennie podana spermidyna może stymulować proces różnicowania kalusa rzepaku (*Brassica napus* var. *oleifera* L.). W badaniach podjęto równocześnie próbę stwierdzenia, czy aktywność metaboliczna, mierzona intensywnością oddychania, wydzielania ciepła i szybkością wzrostu tkanki kalusowej może stanowić dogodny wskaźnik w selekcji tkanek zdolnych do regeneracji.

Tkankę kalusową dwóch odmian rzepaku hodowano dwuetapowo: – na pożywce indukującej namnażanie tkanki (MS z dodatkiem 1 mg BAP·dm⁻³, 0,5 mg 2,4-D·dm⁻³ i 6% sacharozy) oraz – na pożywce stymulującej różnicowanie i regenerację pędów (MS z dodatkiem 3 mg BAP·dm⁻³, 0,1 mg GA₃·dm⁻³ i 3% sacharozy). W trakcie hodowli, pożywki (indukcyjną, regeneracyjną lub obie) wzbogacano dodatkiem 0,3 mmol Spd·dm⁻³. Kultury pasażowano w odstępach 2-tygodniowych z równoczesnym pomiarem świeżej masy tkanki oraz pomiarami intensywności oddychania i wydzielania ciepła. Pod koniec 6-tygodniowego okresu hodowli dokonano wizualnej oceny stopnia zróżnicowania i żywotności tkanki kalusowej.

Młoda, nieróżnicująca tkanka kalusowa charakteryzowała się podobną aktywnością metaboliczną zarówno pod względem intensywności oddychania, jak i wydzielania ciepła bez względu na cechy genomowe. W tkankach starszych pojawiły się istotne różnice międzyodmianowe, wywołane obniżeniem żywotności tkanek odmiany ozimej. Równocześnie w tkance kalusowej, w której obserwowano

pierwsze zmiany strukturalne świadczące o różnicowaniu, zanotowano istotny wzrost aktywności metabolicznej.

Nie obserwowano wpływu Spd na żywotność tkanek kalusowych odmiany jarej, u odmiany ozimej widocznie niekorzystny efekt wywoływała Spd obecna w pożywce regeneracyjnej, inicjując szybsze starzenie się ok. 40% populacji. Egzogenna Spd bez względu na moment aplikacji nie była czynnikiem zdolnym do inicjacji procesu morfogenezy u odmiany ozimej, o niskim potencjale morfogenetycznym. Wykazano natomiast stymulację różnicowania u odmiany jarej, o dużych zdolnościach regeneracyjnych. Spd obecna w trakcie całego okresu hodowli podnosiła efektywność regeneracji o ok. 15%, dodana tylko do pożywki regeneracyjnej o ok. 10%.

METABOLIC ACTIVITY AS A POSSIBLE INDICATOR OF MORPHOGENIC POTENTIAL IN RAPE CALLUS CULTURES – THE EFFECT OF EXOGENOUS SPERMIDINE

Iwona Żur¹, Janusz Kościelniak², Franciszek Dubert¹

¹ Department of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków

² Department of Plant Physiology, Agricultural University, Kraków

Key words: *Brassica napus* L., heat rate, morphogenic potential, polyamines, rape, respiration intensity, spermidine

Summary

In many *in vitro* systems, stress has been identified as the critical factor for morphogenesis initiation. A variety of reports indicate also that in response to stress, polyamine levels and polyamine synthetic enzyme activities may increase. Direct involvement of polyamines in somatic embryogenesis and organogenesis was also confirmed. In the experiment, the effect of exogenous spermidine (Spd) on regeneration ability in callus cultures of two cultivars of *Brassica napus* L. was investigated. The possible utilisation of metabolic activity as a marker of tissue morphogenic potential was also estimated.

Culture period was divided into two phases: – culture on medium stimulating callus induction (MS supplemented with 1 mg BAP·dm⁻³, 0.5 mg 2,4-D·dm⁻³, 6% sucrose) and – culture on medium stimulating shoot regeneration (MS supplemented with 3 mg BAP·dm⁻³, 0.1 mg GA₃·dm⁻³, 3% sucrose). During the whole culture period, culture media (induction, regeneration or both) were supplemented with 0.3 mmol spermidine·dm⁻³. Tissue metabolic activity, expressed as mass growth, respiration rate and heat production, was measured at two-week intervals. To the end of six-week culture, visual assay of calli viability and differentiation degree was performed.

Metabolic activity (respiration rate as well as heat production rate) of young, non-differentiated calli was similar for both tested cultivars. Significant differences, which appeared as a result of increased culture period, had its origin in a decrease of tissue viability of winter cultivar. At the same time, first visual signs of callus differentiation were associated with an increased tissue metabolic activity.

In the case of spring cultivar, no influence of Spd on calli viability was ob-

served, in the culture of winter cultivar – 40 % of calli population decreased its viability when Spd was present in stimulating regeneration medium. No induction of shoot regeneration was obtained with recalcitrant winter cultivar, no matter of the moment of Spd supplement. However, in the case of highly responsive spring cultivar, increased frequency of shoot regeneration was observed as a result of the Spd presence during the whole culture period (15%) or during the regeneration phase (10%).

Dr inż. Iwona Żur
Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN
ul. Podłużna 3
30-239 KRAKÓW