

## INDUKCJA MROZODPORNOŚCI TKANKI KALUSOWEJ PSZENŻYTA (*Triticale*)

Anna Janeczko<sup>1, 2</sup>, Marcin Rapacz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

<sup>2</sup> Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Zdolność roślin do przetrwania okresu temperatur ujemnych uzależniona jest zarówno od cech morfologicznych organizmu jak również właściwości fizjologicznych tkanek i komórek. Na poziomie komórkowym kształtują się bowiem procesy hartowania roślin na czynniki stresowe m.in. takie jak mróz [MARKOWSKI, RAPACZ 1996]. Procesy te są złożone i przebiegają wieloetapowo obejmując zmiany chemiczne (jak np. akumulacja sacharozy czy synteza białek hydrofilowych), ale i modyfikacje fizyczne – głównie zmiany przepuszczalności membran. Jak większość procesów zachodzących w organizmach żywych przygotowywanie organizmu do przeżycia temperatur ujemnych znajduje się w znacznym stopniu pod kontrolą substancji regulatorowych. Funkcjonowanie takich hormonów jak kwas absycynowy (ABA), etylen czy kwas jasmonowy umożliwia uruchomienie reakcji adaptacyjnych organizmu roślinnego pozwalających na przetrwanie w utrudnionych warunkach wegetacji [CHANDLER, ROBERTSON 1994].

Celem badań była ocena wpływu różnych czynników na kształtowanie mrozooporności tkanki kalusowej pszenżyta w warunkach kultur *in vitro*. W doświadczeniach prowadzonych na kalusie tego gatunku poza hartowaniem w temperaturach chłodowych zaproponowano modyfikacje w składzie pożywki, które jak założono, potencjalnie mogłyby przyczynić się do zwiększenia odporności kalusa na mróz: dodatek kwasu absycynowego i zwiększenie stężenia sacharozy. Metody kultur *in vitro*, którymi posłużono się w eksperymencie, pozwalają na szybką, wstępną ocenę wpływu chłodu i stopnia zaangażowania aplikowanych egzogennie substancji regulatorowych na formowanie się odporności na stres mrozowy na poziomie komórek [TANINO i in. 1990; ISHIKAWA i in. 1995; MARKOWSKI, RAPACZ 1996; MORARU i in. 1996].

### Materiał i metody

#### Kultura kalusa pszenżyta

Materiałem doświadczalnym była tkanka kalusowa z dojrzałych zarodków pszenżyta ozimego odmiany Bogo otrzymana na pożywce Murashige-Skooga

(1962), (MS) zawierającej 3% sacharozy, 0,6% agaru i 20 mg kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego (2,4-D). Indukcja tkanki kalusowej pszenżyta na mezokotyłu dojrzałego zarodka (tkanka merystematyczna zarodka stanowiąca odcinek pomiędzy koleoptylem i skutellum) zachodziła w trakcie kiełkowania ziarniaków. Po 7 dniach kiełkowania odcinano i odrzucano kielek oraz korzonki zarodkowe pozostawiając na ziarniakach jedynie kalusujący mezokotył, a wzrost kalusa prowadzono jeszcze przez 10 dni. Kiełkowanie ziarniaków pszenżyta i indukcja kalusa odbywała się na szalkach Petriego, w warunkach 16 godz. fotoperiodu (natężenie napromieniowania  $50 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) i w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ .

### Przebieg eksperymentu

Kalus pszenżyta odcięty od tkanki macierzystej wykładano na szalki Petriego, a następnie hartowano chłodem, a także poddawano działaniu ABA i zwiększonego stężenia sacharozy w pięciu obiektach według poniższego schematu:

Czas wzrostu kultury:	1–7 dzień		8–14 dzień	
Warunki wzrostu kultury:	temperatura	pożywka	temperatura	pożywka
OBIEKT I	+ $25^\circ\text{C}$	MS	+ $25^\circ\text{C}$	MS
OBIEKT II	+ $25^\circ\text{C}$	MS	+ $2^\circ\text{C}$	MS
OBIEKT III	+ $2^\circ\text{C}$	MS	+ $2^\circ\text{C}$	MS
OBIEKT IV	+ $25^\circ\text{C}$	MS	+ $25^\circ\text{C}$	MS + $20 \mu\text{mol}$ (ABA) $\cdot\text{dm}^{-3}$
OBIEKT V	+ $25^\circ\text{C}$	MS	+ $25^\circ\text{C}$	MS + 10% sacharozy

Po 14 dniach kalus pasażowano na pożywkę MS i rozdzielono na dwie serie: nie mrożoną (wzrost kultury w temperaturze  $+25^\circ\text{C}$ ) oraz poddaną działaniu mrozu przez 24 godziny (wzrost kultury w temperaturze  $-10^\circ\text{C}$ ). Od 15 do 28 dnia hodowli kalus rósł na pożywce MS.

### Ocena aktywności metabolicznej tkanki kalusowej pszenżyta oraz pomiary świeżej masy

Aktywność metaboliczną kalusa określano na podstawie reakcji barwnej tkanek pod wpływem 2,3,5-trifenyłodwuchlorowodoru tetrazoliny (TTC). Ten bezbarwny związek, pod wpływem procesów redukcji zachodzących w żywych tkankach, przyjmuje kolor malinowy. Tkanki martwe pozostają niezabarwione.

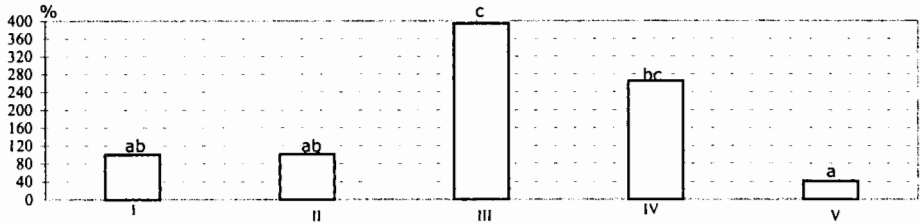
Pomiary absorbancji wyekstrahowanego (temp.  $80^\circ\text{C}$ , łaźnia wodna) z kalusa etanolowego roztworu zredukowanej formy TTC (formazanu) wykonano na spektrofotometrze Ultrospec II przy długości fali świetlnej 490 nm. Przyjmuje się, że absorpcja promieniowania przez ekstrakt jest proporcjonalna do poziomu aktywności metabolicznej tkanki, co świadczyć może o jej żywotności.

Przyrost świeżej masy kalusa oszacowano jako różnicę świeżej masy początkowej (15 dzień kultury) i świeżej masy końcowej (28 dzień kultury).

Pomiar żywotności tkanki oraz przyrostu świeżej masy wykonano po 15 dniach, w przypadku kalusów niemrożonych, oraz po 14 dniach od zakończenia mrożenia, w przypadku kalusów mrożonych w  $-10^\circ\text{C}$ .

## Wyniki

Spośród kalusów pszenżyta nie poddanych mrożeniu, największą żywotnością charakteryzowała się tkanka, która przebywała przez 14 dni w temperaturze  $+2^{\circ}\text{C}$  (wartość redukcji TTC – w procentach kontroli – 394%). Wartość ta była istotnie wyższa niż uzyskana dla tkanek nie poddanych działaniu chłodu (kontrola), (rys. 1). Dość wysoką aktywność metaboliczną (wartość redukcji TTC 264%) wykazał kalus traktowany egzogennym kwasem absycynowym. Obniżenie żywotności tkanki zaobserwowano natomiast na pożywkach z podwyższoną ilością sacharozy, co znalazło wyraz również w słabszych przyrostach świeżej masy (rys. 2).

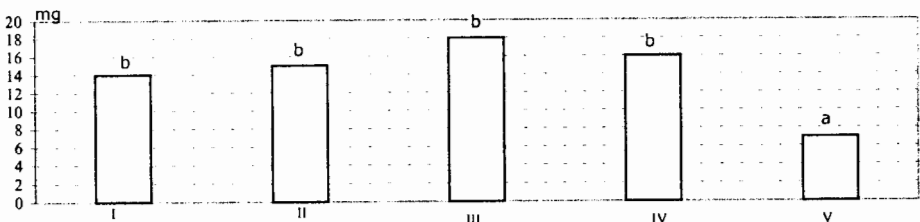


- I – kalus niehartowany (kontrola); non-acclimated callus (control)  
 II – kalus hartowany chłodem 7 dni ( $+2^{\circ}\text{C}$ ); callus acclimated 7-days at  $+2^{\circ}\text{C}$   
 III – kalus hartowany chłodem 14 dni ( $+2^{\circ}\text{C}$ ); callus acclimated 14-days at  $+2^{\circ}\text{C}$   
 IV – kalus traktowany  $20\ \mu\text{m ABA}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; callus treated  $20\ \mu\text{m ABA}\cdot\text{dm}^{-3}$  medium  
 V – kalus traktowany podwyższoną dawką sacharozy (13%); callus treated high dose of sucrose (13% in medium)

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana,  $\alpha = 0,05$ ; Values marked with the same letter are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Test

Rys. 1. Aktywność metaboliczna tkanki kalusowej pszenżyta nie poddanej mrożeniu wyrażona wartością względnego stopnia redukcji TTC (wartości w % względem wartości kontroli)

Fig. 1. The influence of low temperature and media modifications on vitality of winter *Triticale* callus showed as relative rate of TTC reduction (values in percentage with respect to control)

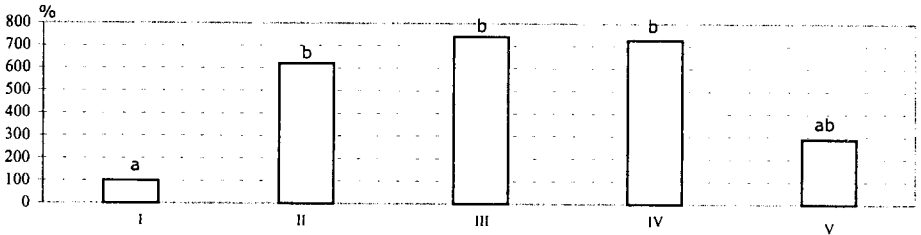


I, II, III, IV, V – objaśnienia jak pod rys. 1; explanations see Fig. 1

Rys. 2. Wpływ temperatur chłodowych oraz modyfikacji pożywki na przyrost świeżej masy tkanki kalusowej pszenżyta nie poddanej mrożeniu

Fig. 2. The influence of cold temperature and media modifications on fresh weight of winter *Triticale* callus

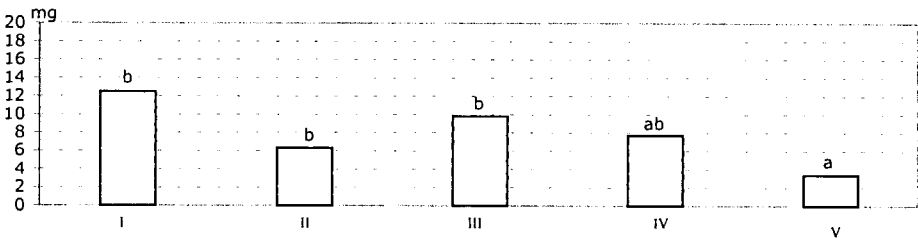
W przypadku kalusa poddanego mrożeniu w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$  najlepszą przeżywalnością charakteryzował się kalus hartowany chłodem przez 7 i 14 dni (wartości stopnia redukcji TTC, odpowiednio 610% i 741%) ale również kalus traktowany uprzednio ABA (721%). Wartości te były istotnie dużo wyższe niż uzyskane dla niezahartowanej tkanki kalusowej (rys. 3). Kalus chłodzony oraz poddany działaniu ABA wykazywał nieznacznie słabszy przyrost masy względem kalusa niehartowanego (rys. 4). Egzogenna sacharoza nie wpływała na podwyższenie mrozoodporności tkanki pszenżyta.



I, II, III, IV, V – objaśnienia jak pod rys. 1; explanations see Fig. 1

Rys. 3. Aktywność metaboliczna tkanki kalusowej pszenżyta poddanej działaniu temperatur mrozowych ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) wyrażona wartością względną stopnia redukcji TTC (wartości w % względem wartości kontroli)

Fig. 3. The influence of cold temperature and media modifications on frost resistance of *Triticale* callus showed as relative rate of TTC reduction (values in percentage with respect to control)



I, II, III, IV, V – objaśnienia jak pod rys. 1; explanations see Fig. 1

Rys. 4. Przyrost świeżej masy kalusa poddanego mrożeniu w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$

Fig. 4. Increase of callus fresh weight during 14 days after freezing

## Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują na ujawnianie się w kulturach *in vitro* pszenżyta mrozoodporności komórkowej opisywanej przez MARKOWSKIEGO i RAPACZA [1996]. Hartowanie chłodem zwiększyło przeżywalność tkanki pszenżyta w mrozie i wpływało następnie na podwyższenie aktywności metabolicznej kalusa niemrożonego. Korzystny wpływ obniżonej temperatury na żywotność kalusa i mrozoodporność był już obserwowany w kulturach tkankowych innych gatunków m.in. rzepaku (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) [MARKOWSKI, RAPACZ 1996]. Uważa się, że działanie chłodu pobudza komórki do intensywniejszych podziałów, a niska temperatura nie sprzyja jedynie ich wzrostowi objętościowemu [DAWID 1997].

Kwas abscysynowy jest najlepiej poznanym hormonem roślin kształtującym odporność na mróz, a także na suszę, zasolenie podłoża i działanie wysokich temperatur [ISHIKAWA i in. 1995; MORARU i in. 1996]. U podstaw reakcji odpornościowych indukowanych przez ABA leżą zmiany ekspresji genów wiązanych m.in. z metabolizmem termostabilnych białek oraz prolina, a także ekonomizacja gospodarki wodnej [PETCU i in. 1996, 1999]. Dodatek kwasu abscysynowego do pożywki kultur indukował przeżywalność kalusa pszenżyta w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$  w stopniu porównywalnym do hartowania chłodem. Obecnie wiadomo, że związek ten przyczynia się do wzrostu mrozoodporności w kulturach zawieszin rzepaku (*Brassica napus*) i stokłosa (*Bromus inermis* OLEYSS.) oraz w kulturach embriogenicznego kalusa pszenicy (*Triticum aestivum* L.) [JOHNSON-FLANAGAN i in. 1991; LEE i in. 1993; DALLAIRE i in. 1994]. Wykazano także, iż w wyniku hodowli w temperaturach chłodowych podnosi się zawartość endogennego ABA w kalusie topoli (*Populus tremula* L.) [JOUVE i in. 2000]. W omawianym doświadczeniu pod wpływem ABA obserwowano także wzmożoną aktywność metaboliczną w tkankach nie poddawanych mrożeniu, co wydaje się być wynikiem mobilizacji metabolizmu przez ABA, w celach sprzyjającej adaptacji kalusa do warunków stresu.

Obecność egzogennej sacharozy w pożywce miała na celu obniżenie potencjału wody w komórkach kalusa. W warunkach naturalnych zjawiska te spełniają rolę ochronną w tzw. I etapie hartowania [SALISBURY, ROSS 1975]. W zastosowanym układzie doświadczalnym egzogenna sacharoza w stężeniu 10% obniżała żywotność oraz osłabiała przyrosty świeżej masy tkanki kalusowej pszenżyta i nie wpłynęła na podniesienie mrozoodporności.

### Wnioski

1. Na podniesienie mrozoodporności kalusa pszenżyta wpływają korzystnie temperatury chłodowe zastosowane przed mrożeniem.
2. Egzogeny kwas abscysynowy indukuje mrozoodporność tkanki kalusowej pszenżyta w stopniu porównywalnym z działaniem chłodu.
3. Podwyższenie ilości egzogennej sacharozy w pożywce do wzrostu kultur kalusa pszenżyta nie stymuluje istotnie mrozoodporności tej tkanki.

### Literatura

- CHANDLER P., ROBERTSON M. 1994. *Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 113–141.
- DALLAIRE S., HOUDE M., GAGNE Y., SAINI H., BOILEAU S., CHEVRIER N., SARHAN F. 1994. *ABA and low temperature induce freezing tolerance via distinct regulatory pathways in wheat*. Plant Cell Physiol. 35(1): 1–9.
- DAWID K. 1997. *Wpływ temperatur chłodowych i mrozowych na szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną tkanki kalusowej wybranych odmian rzepaku ozimego*. Praca magisterska AR Kraków.
- ISHIKAWA M., ROBERTSON A.J., GUSTA L.V. 1995. *Comparison of viability tests for*

assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) suspension cultured cells. *Plant Science* 107: 83–93.

JOHNSON-FLANAGAN A.M., HUIWEN Z., THIAGARAJAH M.R., SAINI H.S. 1991. The role of abscisic acid in the induction of freezing tolerance in *Brassica napus* suspension cultured cells. *Plant Physiol.* 95: 1044–1048.

JOUVE L., FRANCK T., GASPAR T., CATTIVELLI L., HAUSMAN J.F. 2000. Poplar acclimation to cold during *in vitro* conservation at low non-freezing temperature: metabolic and protein changes. *J. Plant Physiology* 157: 117–123.

LEE S.P., CHEN T.H.H. 1993. Molecular cloning of abscisic acid-responsive mRNAs expressed during the induction of freezing tolerance in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) suspension culture. *Plant Physiol.* 101: 1089–1096.

MARKOWSKI I., RAPACZ M. 1996. Wrażliwość tkanki kalusowej różnych odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) na temperatury mrozowe. I Ogóln. konf. „Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin” 15–17 XII 1994 Kraków: 243–260.

MORARU I., RADUCANU F., PECTU E. 1996. The influence of abscisic acid on callus evolution at some winter wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Probleme de Genetica Teoretica si Aplicata* (Romania) 28(2): 87–92.

PETCU E., DORFFLING K., SAULESCU N.N., ITTU G. 1999. The aspects of abscisic acid implications in cold hardening process of wheat. *Probleme de Genetica Teoretica si Aplicata* (Romania) 31: 1–2, 45–58.

PETCU E., ITTU G., MUSTATEA P. 1996. The effect of exogenous ABA treatment on the freezing tolerance in wheat plants (*Triticum aestivum* L.). *Probleme de Genetica Teoretica si Aplicata* (Romania) 28(2): 77–85.

SALISBURY F., ROSS C. 1975. *Fizjologia Roślin*. PWRiL, Warszawa: 838 ss.

TANINO K., WEISER C.J., FUCHIGAMI L.H., CHEN T.H.H. 1990. Water content during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass cell. *Plant Physiol.* 93: 460–464.

**Słowa kluczowe:** *Triticale*, kalus, mrozoodporność, hartowanie, kwas absycynowy (ABA)

### Streszczenie

Celem eksperymentu była ocena wpływu różnych czynników hartowania na kształtowanie mrozoodporności tkanki kalusowej pszenżyta w środowisku *in vitro*. Poza hartowaniem w temperaturach chłodowych (+2°C) zaproponowano modyfikacje w składzie pożywki, takie jak: dodatek kwasu absycynowego oraz podwyższenie stężenia sacharozy, które potencjalnie mogłyby przyczynić się do zwiększenia odporności kalusa na mróz. Metody kultur *in vitro*, którymi posłużono się w eksperymencie, pozwalają na szybką, wstępną ocenę wpływu chłodu i stopnia zaangażowania aplikowanych egzogennie substancji regulatorowych w formowaniu się mrozoodporności na poziomie komórek. Żywotność tkanki poddanej czynnikom hartującym oraz mrożeniu, oceniano na podstawie reakcji barwnej

chlorowodorku tetrazoliny (TTC).

W kulturach *in vitro* pszenżyta uzyskano odpowiedź tkanki kalusowej na czynniki hartujące. Na podniesienie mrozoodporności kalusa pszenżyta wpływały korzystnie temperatury chłodowe zastosowane przed mrożeniem. Egzogeny kwas abscysynowy indukował mrozoodporność tkanki kalusowej pszenżyta w stopniu porównywalnym z działaniem chłodu. Natomiast podwyższenie ilości egzogennej sacharozy w pożywce do wzrostu kultur kalusa pszenżyta nie stymulowało istotnie mrozoodporności tej tkanki.

## INDUCTION OF FROST RESISTANCE IN *Triticale* CALLUS TISSUE

Anna Janeczko<sup>1,2</sup>, Marcin Rapacz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Physiology, Polish Academy of Science, Kraków

<sup>2</sup> Chair of Plant Physiology, Agriculture University, Kraków

Key words: *Triticale*, callus, frost-resistance, cold acclimation, ABA

### Summary

The effect of low temperature and media modifications on the evolution of frost tolerance in *Triticale* callus tissue were investigated. Callus was obtained from mature *Triticale* embryos. Callus initiation and proliferation were carried out on Murashige-Skoog (MS) medium containing 20 mg of 2,4-D. Cali were: (a) exposed to cold (temp. of +2°C for 7 days and 14 days respectively); (b) cultured on medium containing ABA (20  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) for 14 days and (c) exposure of tissue to a medium with an elevated sucrose content (13%) for 14 days. Cali grown on MS medium at 25°C were used as the control. After hardening, cali were exposed to frost (-10°C) for 24 hours, then the vitality of the tissues was estimated by means of the tetrazoline test and determination of increase in cali fresh weight. *In vitro* culture, used in this experiment, made possible quick estimation of the influence of hardening factors and methods in the creation of frost-resistant *Triticale* tissue on a cellular level. It was found that both exposure to chilling temperatures and exposure to exogenous abscisic acid had a stimulating influence on development of frost-resistance in *Triticale* tissue. Exposure to an increased concentration of sucrose however, did not stimulate frost-resistance of the tissue.

Dr inż. Anna Janeczko

Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego

Polska Akademia Nauk

ul. Podłużna 3

30-239 KRAKÓW

e-mail: Anna.Janeczko@poczta.fm