

PRZELAMYWANIE DOMINACJI WIERZCHOŁKOWEJ U PODKŁADKI JABŁONI M7 W KULTURACH *IN VITRO*

The release of apical dominance in the apple-tree rootstock M7 *in vitro* culture

Ewa PŁAŻUK, Krystyna KROMER

Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, Pracownia Kultur Tkankowych,
ul. Śienkiewicza 23, 50-335 Wrocław

WPROWADZENIE

Dominacja wierzchołkowa pędu przejawia się całkowitym lub prawie całkowitym zahamowaniem wzrostu pąków bocznych na skutek obecności pąka szczytowego. Ten rodzaj inhibicji korelacyjnej jest szeroko rozpowszechniony u roślin. Jej nasilenie określają czynniki genetyczne, środowiskowe oraz w dużym stopniu fizjologiczny wiek rośliny [Wilkins 1976].

Kluczową rolę regulacyjną w dominacji wierzchołkowej odgrywają fitohormony, jednakże pomimo wielu badań nie udało się jednoznacznie określić mechanizmów ich działania. Rozważania nad ich znaczeniem w hamowaniu pąków bocznych dotyczą wielu systemów badawczych, które obejmują różne rośliny [Cline 1991, Šebanek i in. 1991]. W klasycznych eksperymentach Thimann i Skoog [1934] udowodnili inhibycyjną rolę auksyny w dominacji wierzchołkowej. Według ich teorii auksyna transportowana bazypetalnie z wierzchołka pędu, gdzie jest syntetyzowana hamuje bezpośrednio rozwój pąków kątowych [Thimann i Skoog 1934, Thimann 1937]. Wiele badaczy dopuszcza udział w tym zjawisku innych substancji wykazujących charakter inhibitorów wzrostu [Libbert 1964, Godwin i Cansfield 1967]. Nieco później ustalono udział cytokininy w uwalnianiu pąków spod korelacyjnego hamowania [Sachs i Thimann 1964, Pillay i Railton 1983]. W ostatnich czasach wiele uwagi poświęca się interakcjom między fitohormonami i sposobom ich transportu w roślinie [Bangerth 1994, Li i in. 1995]. Jedną ze współczesnych teorii tłumaczy zahamowanie wzrostu pąków bocznych nadmiarem w nich auksyny, której odpływ jest zablokowany na

zasadzie autoinhibicji przez auksynę transportowaną dopodstawowo z wierzchołka pędu. Stymulacja rozwoju pąków po zadziałaniu na nie cytokinina polegać może na pobudzaniu eksportu auksyny z pąków śpiących [Li i Bangerth 1992].

Zakres nadrzędności pąka szczytowego względem pąków niżej położonych na pędzie może być różny u różnych gatunków roślin. Podkładka jabłoni M7 wykazuje silną dominację wierzchołkową. Charakteryzuje się słabym wzrostem wydłużeniowym. Przypuszcza się, że za zwarty pokrój tych roślin odpowiedzialne są inhibitory wzrostu, a wśród nich występujące w tkankach liczne pochodne związków fenolowych.

Kultury *in vitro* stwarzają możliwość kierowania organogenezą przede wszystkim za pomocą fitohormonów. Pozwala to na poprawę wydajności rozmnażania roślin i zapewnia konkurencyjność w stosunku do tradycyjnych technik [Jones i Sluis 1991]. Namnażanie materiału roślinnego poprzez tworzenie pędów z pąków pachwinowych jest szeroko rozpowszechnione ze względu na wysoką gwarancję stabilności genetycznej roślin potomnych. Merystemy lateralne zakładane w kątach liści mają identyczną budowę histologiczną i strukturę genetyczną jak merystemy wierzchołkowe. Przy tym sposobie rozmnażania rzadko dochodzi do rozszczepienia cech czy zmiany ploidalności [Jankiewicz 1984]. Efektywność mikro-rozmnażania zależy od możliwości zniesienia dominacji wierzchołkowej.

MATERIAŁ I METODY

Źródło mikrosadzonek. Prowadzono kultury pędów podkładki jabłoni M7 (*Malus pu-*

mila Mill.). Podkładka M7 należy do półkarłowatych, jest odporna na zgniliznę pierścieniową, ale wrażliwa na mróz. Najczęściej szczepli się na niej odmiany Idared i Spartan. Eksplantatami inicjalnymi dla kultur *in vitro* były merystemy wierzchołkowe oraz boczne pędu podkładki jabłoni M7. Pobierano je z pędów poddanych dezynfekcji. Składały się z kopuły merystemu i dwóch par zawiązków liściowych. Po izolacji w komorze z laminarnym przepływem powietrza merystemy wyszczepiano na pożywkę Quoirin-Lepoivre (QL) [Quoirin i Lepoivre 1977], zawierającą dodatkowo kinetynę ($0,2 \text{ mg/dm}^3$) oraz kwas indoliloctowy (IAA $0,2 \text{ mg/dm}^3$).

Prowadzenie kultury pędów. Pędy rozwijające się z merystemów przenoszono na pożywkę QL z odpowiednio dobranym stężeniem dodawanych fitohormonów [Kromer 1987]: 6-benzyladenina (BA $0,5 \text{ mg/dm}^3$), kwas indolilomasłowy (IBA $0,1 \text{ mg/dm}^3$), kwas giberelinowy (GA_3 2 mg/dm^3). Kulturę proliferujących pędów prowadzono w fitotronie w temp. $24\text{--}26^\circ\text{C}$ przy oświetleniu pochodzącym ze świetłówek typu Day Light o natężeniu 2500 lx . W celu uzyskania większej ilości materiału roślinnego konieczne było przemnożenie pędów podkładki M7. Mikrorozmnażanie prowadzono na pożywce QL o składzie jw. Pędy dzielono na fragmenty jedno lub kilkunowułowe i poprzez stymulację pąków bocznych uzyskiwano pędy rozwijające się z merystemów bocznych, zlokalizowanych w pachwinach liści.

Przelamywanie dominacji wierzchołkowej. Zastosowano trzy systemy badawcze, w których analizowano rozwój pąków kątowych:

- inicjacja rozwoju pąków podwierzchołkowych po odcięciu wierzchołka;
- rozwój pąków pachwinowych w kulturach pojedynczych węzłów;
- stymulacja pąków bazalnych po aplikacji do pożywki cytokininy.

Wpływ fitohormonów i wieku plastochronowego na podejmowanie rozwoju i wzrost elongacyjny pąków pachwinowych uwolnionych od korelacyjnego hamowania

i. Pędy podkładki jabłoni M7 ukorzenione na pożywce QL z dodatkiem $1,0 \text{ mg/dm}^3$ IBA poddano dekapitacji, a następnie umieszczono

na pożywkach: QL; QL+ $1,0 \text{ mg/dm}^3$ IBA; QL+ fitohormony ($0,5 \text{ mg/dm}^3$ BA, $0,1 \text{ mg/dm}^3$ IBA, $2,0 \text{ mg/dm}^3$ GA_3). Badano czy aplikowane regulatory mają wpływ na liczbę rozwijających się pąków podwierzchołkowych i elongację pędów po 3 tygodniach kultury.

ii. Testowano różne dawki cytokininy ($0,125$; $0,25$; $0,5$ oraz $0,75 \text{ mg/dm}^3$ BA) stymulującej rozwój pąków bazalnych na pędzie. Po 3 tygodniach kultury zestawiono efektywność pobudzania pąków do wzrostu na pożywkach: QL; QL z dodatkiem cytokininy; QL+ fitohormony ($0,5 \text{ mg/dm}^3$ BA, $0,1 \text{ mg/dm}^3$ IBA, $2,0 \text{ mg/dm}^3$ GA_3), QL+ $1,0 \text{ mg/dm}^3$ IBA; QL+ kwas abscysynowy ($0,25$ i $0,5 \text{ mg/dm}^3$ ABA).

iii. 6-tygodniowe pędy z pożywki do namnażania dzielono na fragmenty jednowęzłowe i umieszczano na pożywce QL z dodatkiem różnych regulatorów wzrostu: BA ($0,25$ oraz $0,5 \text{ mg/dm}^3$), IBA ($1,0 \text{ mg/dm}^3$) lub ABA ($0,25 \text{ mg/dm}^3$). Po 3 i 6 tygodniach kultury analizowano wpływ egzogennie podanego fitohormonu na długość pędu z pąka pachwinowego wybijającego na węzle.

iv. Początkowe stadia rozwoju pąków pachwinowych były śledzone przy użyciu binokularu. Przeanalizowano w ciągu pierwszych 10 dni rozwój pąków w kulturach fragmentów jednowęzłowych. Pobierano węzły pochodzące z tego samego regionu pędu, tzn. o tym samym wieku plastochronowym i umieszczano je na trzech różnych pożywkach: QL; QL+ fitohormony (BA $0,5 \text{ mg/dm}^3$, IBA $0,1 \text{ mg/dm}^3$, GA_3 $2,0 \text{ mg/dm}^3$) oraz QL+ BA ($0,25 \text{ mg/dm}^3$).

v. Pędy uzyskane na pożywce do namnażania podzielono na trzy strefy: podwierzchołkową, środkową i bazalną. Badano rozwój pąków z fragmentów jednowęzłowych o różnym wieku plastochronowym hodowanych na pożywkach: QL; QL+ fitohormony (BA $0,5 \text{ mg/dm}^3$, IBA $0,1 \text{ mg/dm}^3$, GA_3 $2,0 \text{ mg/dm}^3$) i QL+ IBA ($1,0 \text{ mg/dm}^3$).

WYNIKI I DISKUSJA

W badaniach nad rozwojem pąków pachwinowych podkładki jabłoni M7 zastosowano trzy sposoby przelamywania dominacji wierzchołkowej: dekapitację pędu, egzogenną cytokininę w pożywce, fragmentację pędu.

W doświadczeniach przeprowadzonych na ukorzenionych pędach poddanych dekapitacji odnotowano różną liczbę wybijających pąków podwierzchołkowych oraz niejednakowe tempo wzrostu w zależności od kombinacji pożywki, na jakiej hodowano pędy. W przypadku zastosowania auksyny obserwowano rozwój jednego pędu z pierwszego pąka znajdującego się pod powierzchnią cięcia usuwanego wierzchołka. Na pożywce kontrolnej rozwijały się zwykle dwa kolejne najmłodsze pąki podwierzchołkowe, a po pewnym czasie jeden z nich zaczynał górować, by przejąć rolę usuniętego pąka szczytowego. Dodatek do pożywki auksyny, cytokininy oraz gibereliny inicjował rozwój 3–5 pąków podwierzchołkowych, przy czym najsilniejszą elongację wykazywały pędy najwyższej położone.

Zastosowanie egzogennej cytokininy pozwoliło na uwalnianie pąków bazalnych od korelacyjnej inhibicji. Najwięcej pędów (3–4 na pędzie macierzystym) uzyskano przy wyższych stężeniach BA, jednakże wysokie dawki cytokininy nie są pożądane w kulturach *in vitro* ze względu na pojawianie się nadmiernie uwodnionych, tzw. szklitych pędów, które są słabej jakości i wykazują anomalie wzrostowe [Paques 1991]. Optymalne do pobudzania pąków bazalnych są niższe dawki BA, które cechuje duża wydajność (średnio 2,5–3 rozwijających się pąków na pędzie). Nie dochodziło

do stymulacji pąków bazalnych na pożywce kontrolnej bez regulatorów i na pożywkach z auksyną oraz kwasem abscysynowym, który w procesach wzrostu pełni rolę inhibitora. Po 3 tygodniach kultury najlepszą elongację młodych pędów odnotowano na pożywce z kompletnym zestawem fitohormonów (BA, IBA, GA₃).

W kulturach fragmentów jednowęzłowych najbardziej intensywny wzrost pędów z merystemów lateralnych uzyskano przy zastosowaniu 6-benzyladeniny (BA). Po 6 tygodniach kultury wyhodowano najdłuższe pędy stosując BA w dawce 0,25 mg/dm³ (~1.0 mM) [tab. 1]. Trochę słabszą elongację pędów obserwowano dla dwukrotnie wyższego stężenia BA. Przez pierwsze trzy tygodnie kultury pąki kątowe na pożywce z auksyną (IBA) pozostawały uśpione. Po tym czasie inhibicji pędy podjęły wzrost. Ich długość po 6 tygodniach była porównywalna z długością pędów rozwijających się na pożywce kontrolnej. Dodatek do pożywki ABA spowodował całkowite zahamowanie rozwoju pąków bocznych z fragmentów jednowęzłowych. Efekt ten utrzymywał się w czasie 6 tygodni prowadzenia obserwacji [tab. 1].

Analiza mikroskopowa pozwoliła na uchwycenie inicjacji rozwoju pąków pachwinowych w kulturach pojedynczych węzłów na różnych pożywkach. Dodatek cytokininy oraz w przypadku drugiej pożywki trzech fitohor-

Tab. 1. Wpływ fitohormonów (BA, IBA, ABA) dodanych do pożywki QL (Quoirin, Lepoivre) na długość pędów wytworzonych z pąków pachwinowych w hodowli fragmentów jednowęzłowych po 3 i 6 tygodniu
Tab. 1. Effect of fitohormones applied in medium QL on length of shoots from axillary buds after 3 and 6 weeks when one-nodal fragments were cultured

Pożywka Medium	Średnia długość pędu [mm] Average length of shoot	
	tygodnie kultury weeks of culture	
	3	6
QL	3,18	4,18
QL+ 0,25 BA	9,00	19,44
QL+ 0,5 BA	4,82	16,44
QL+ 1,0 IBA	0,62	3,88
QL+ 0,25 ABA	0,08	0,57

monów (cytokininy, auksyny, gibereliny) spowodował pojawienie się pierwszych oznak rozwoju pąków już po 3 dniach hodowli [tab. 2]. Podczas gdy na pożywce kontrolnej nie zawierającej regulatorów wyraźne było opóźnienie w podejmowaniu wzrostu przez pąki (5 dzień kultury), a ich elongacja podczas 10 dni hodowli była ok. 3 razy słabsza niż na pożywce z samą BA oraz ok. 4,5 razy słabsza niż przy zastosowaniu trzech fitohormonów [tab. 2].

W kolejnych doświadczeniach sprawdzano czy wiek plastochronowy węzła wpływa na rozwój pędu z merystemu lateralnego. Pęd podkładki jabłoni M7 podzielono na trzy strefy: podwierzchołkową, środkową i bazalną, w obrębie których badano przebieg wzrostu pąków kątowych z fragmentów jednowęzłowych. Najlepszą pożywką stymulującą wzrost pędów z pąków pachwinowych okazała się ta z dodatkiem trzech fitohormonów: BA, IBA, GA₃. Najsilniej na dodatek regulatorów wzrostu reagowały pąki ze strefy podwierzchołkowej. Po 6 tygodniach kultury odnotowano, że pędy rozwijające się z węzłów z tej strefy pędu hodowane na pożywce z fitohormonami 4-krotnie przewyższały pędy rosnące na kontroli. Natomiast pędy pochodzące z części bazalnej hodowane na tej samej pożywce były zaledwie 1,3 razy dłuższe od rosnących na kontroli [tab. 3]. Ukazuje to, że pąki położone bliżej wierzchołka cechuje większa wrażliwość na stymulatory wzrostu zaaplikowane w pożywce, a

szczególnie na cytokininę. Dodatek do pożywki samej tylko auksyny spowodował, że w ciągu trzech pierwszych tygodni kultury wszystkie pąki wykazywały opóźnienie w podejmowaniu wzrostu w porównaniu z kontrolą. Po 6 tygodniach hodowli na tej pożywce zaobserwowano, że pąki pachwinowe o rosnącym wieku plastochronowym cechował słabszy rozwój. Pędy powstające z pąków bazalnych były 1,7 razy krótsze niż pochodzące ze strefy podwierzchołkowej [tab. 3].

WNIOSKI

Badania nad uwalnianiem pąków kątowych spod hamującego wpływu wierzchołka przyczyniły się do lepszego poznania roli wybranych fitohormonów w inicjacji rozwoju oraz wzroście elongacyjnym pędów bocznych podkładki jabłoni M7 w warunkach *in vitro*. We wszystkich trzech systemach badawczych odnotowano stymulujący wpływ cytokininy zarówno w początkowych stadiach rozwoju pąków jak i podczas wzrostu pędów z merystemów lateralnych. Wykazano jak istotny jest właściwy dobór dawki użytej BA do wykształcania pędów dobrej jakości, nie objętych procesem witryfikacji. Zastosowanie auksyny spowodowało znaczne opóźnienie w podejmowaniu wzrostu i słabą elongację pędów bocznych. Natomiast aplikacja kwasu abscysynowego w pożywce przywróciła pąkom pachwinowym stan całkowitego uspienia, taki jak przed

Tab. 2. Wpływ fitohormonów na inicjację rozwoju i pierwszy etap wzrostu pąków uwolnionych od dominacji wierzchołkowej po fragmentacji pędu i hodowli fragmentów jednowęzłowych w czasie 10 dni

Tab. 2. Effect of fitohormones on buds growth initiation and the first stage of development during 10 days after released of apical dominance through one-nodal fragment culture

Pożywka Medium	Średnia długość pąka [μm] Average length of bud									
	Dni kultury Days of culture									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
QL	3	3	3	3,5	5	8	10	13	15	18
QL+ 0,25 BA	4,5	7	10	15	25	30	35	45	48	50
QL+ 0,5 BA, 0,1 IBA, 2,0 GA ₃	4	8	10	20	35	40	45	52	58	60

Tab. 3. Wpływ fitohormonów dodanych do pożywki na podejmowanie wzrostu i wydłużanie pąków kątowych w hodowli fragmentów jednowęzłowych pochodzących ze stref pędu o różnym wieku plastochronowym

Tab. 3. Effect of fitohormones applied in medium on growth stimulation and elongation of axillary buds in one-nodal culture from different parts of the stem (the other plastochrone age)

Pożywka Medium	Średnia długość pędu [mm] Average length of shoot					
	Strefa pędu Shoot zone					
	podwierzchołkowa undertop		środkowa middle		bazalna basal	
	3 tygodnie kultury 3 weeks of culture	6 tygodni kultury 6 weeks of culture	3 tygodnie kultury 3 weeks of culture	6 tygodni kultury 6 weeks of culture	3 tygodnie kultury 3 weeks of culture	6 tygodni kultury 6 weeks of culture
QL	3,69	4,46	2,33	5,07	2,81	5,6
QL+ 0,5 BA, 0,1 IBA, 2,0 GA ₃	3,41	17,64	2,7	8,5	2,65	7,33
QL+ 1,0 IBA	1,38	10,5	1,46	6,94	1,37	6,22

zastosowaniem zabiegów znoszących dominację wierzchołkową. Pożywka optymalna, na której dochodziło do szybkiej inicjacji pędów z pąków oraz ich najintensywniejszych przyrostów wymagała obecności zarówno cytokininy (BA) jak i określonych dawek auksyny (IBA) oraz gibereliny (GA₃). W pędzie podkładki jabłoni M7 wyróżniono trzy strefy pędu na podstawie wrażliwości pąków pochodzących z tych stref na aplikowane w pożywce fitohormony. Pąki podwierzchołkowe odpowiadały najsilniejszym wydłużaniem na podawane stymulatory, w porównaniu z pąkami niżej położonymi na pędzie, co predestynuje wyższe, młodsze partie pędu do rozwoju.

SUMMARY

Apical dominance and its control attract attention of both plant physiologists and agronomists. Despite the five decades of lasting effort its physiological mechanism has not yet been sufficiently elucidated. It may be defined as the control exerted by the shoot apex over the out growth of the lateral buds. A key role in regulation of apical dominance is generally ascribed to phytohormones.

The apple-tree rootstock M7 has strong apical dominance. Three investigative systems of release of correlative inhibition were used: decapitation of rooting shoot led to activation of buds under cutting apex; axillary bud outgrowth from one-nodal fragments; addition to medium cytokinin stimulating branching from basal region of the stem. We studied some growth regulators: BA, IBA, GA₃ and ABA in the control of the axillary buds initiation and development. The aim was choosing the proper medium to buds stimulation for *in vitro* micropropagation. The best for growth initiation of lateral buds was addition of benzylaminopurine (BA 0,25 mg/dm³). The most suitable for effective lateral shoot elongation is QL medium with addition of BA (0,5 mg/dm³), IBA (0,1 mg/dm³), GA₃ (2 mg/dm³). A study was made by the relationship between the localization of the axillary bud on the stem and their potential rate of growth. Data indicated that buds from upper region near shoot apex developed better in comparison with middle and basal segments. This effect showed different sensitiveness of axillary buds proceeded from various regions to stimulators applied in medium.

LITERATURA

- Bangerth F.**, 1994. Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to decapitation and auxin treatment and relationship to apical dominance. *Planta* 194: 439-442.
- Cline MG.**, 1991. Apical dominance. *Bot. Rev.* 57: 318-358.
- Godwin PB., Cansfield PE.**, 1967. The control of branch growth on potato tubers III. The basis of correlative inhibition. *J. Exp. Bot.* 18: 297-307.
- Jankiewicz LS.**, 1984. *Fizjologia roślin sadowniczych*. PWN, Warszawa.
- Jones JB., Sluis CJ.**, 1991. Marketing of micropropagated plants. In: Debergh PC., Zimmerman RH., eds. *Micropropagation: technology and application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 141-154.
- Kromer K.**, 1987. Hardening and rooting of M7 apple rootstock cultures. Symposium on Plant Micropropagation in Horticultural Industries, Arlon, Ducte G., Jacob M., Simeon A., eds. *Presses Universitaires, Liege*, pp. 119-123.
- Li C-J., Bangerth F.**, 1992. The possible role of cytokinins, ethylene and indoleacetic acid in apical dominance. In: Karssen CM., van Loon LC., Vreugdenhil D., eds. *Progress in plant growth regulation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 431-436.
- Li C-J., Guevera E., Herrera J., Bangerth F.**, 1995. Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Physiol. Plant.* 94: 465-469.
- Libbert E.**, 1964. Significance and mechanism of action of natural inhibitors. In: *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 387-405.
- Paques M.**, 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Hort.* 289: 283-290.
- Pillay I., Railton ID.**, 1983. Complete release of axillary buds from apical dominance in intact, light-grown seedlings of *Pisum sativum* L. following a single application of cytokinin. *Planta* 71: 972-974.
- Quoirin M., Lepoivre P.**, 1977. Etude de mixel adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Physiol. Plant.* 13: 473-497.
- Sachs T., Thimann KV.**, 1964. Release of lateral buds from apical dominance. *Planta* 201: 939-940.
- Šebanek J., Sladký Z., Procházka S.**, 1991. Experimental morphogenesis and integration of plants. Development in crop science, Elsevier, New York, pp. 180-184.
- Thimann KV.**, 1937. On the nature of inhibitors caused by auxin. *Amer. J. Bot.* 24: 407-412.
- Thimann KV., Skoog E.**, 1934. On the inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia faba*. *Proc. Roy Soc., London, Ser. B* 114: 317-339.
- Wilkins MB.**, 1976. *Fizjologia wzrostu i rozwoju roślin*. PWR i L, Warszawa.