ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXIX, (1): 25-42, 1976

Badanie wzrostu kultur korzeniowych oraz tworzenia i wzrostu *in vitro* kalusów z różnych organów marchwi odmiany 'Perfekcja'

ANNA MARIA DOMAŃSKA i ALDONA RENNERT

Zakład Fizjologii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii Uniwersytetu w Łodzi

(Przyjęto dn. 10.4.1975 r.)

A. M. Domańska and A. Rennert (*Institute of Cytology and Physiology University of Łódź; Banacha* str. *12/16; 90-237 Łódź; Poland*) Acta Agrobotanica 29 (1): 25-42, 1976.

Growth and callus formation of tissue cultures derived from various carrot organs

The clones of excised roots, leaves, petioles, cotylenods, hypocotyls and root calluses derived from the respective carrot fragments (cv. 'Perfekcja' commonly cultivated in Poland) were cultured *in vitro*. An influence of thiamine concentrations on the growth of root tissue was examined. Several various media were tested for callus cultures. Bee bread extract was also applied. The growth of isolated clones during early and later culture periods was compared.

CEL PRACY

Celem pracy było wyprowadzenie stałej kultury korzeni i kalusów pochodzących z różnych organów marchwi, powszechnie uprawianej w kraju odmiany 'Perfekcja'. Miały one służyć jako materiał do uzyskania monoksenicznej hodowli nicieni porażających w warunkach polowych tę roślinę oraz do badań porównawczych infekcyjności *Meloidogyne hapla* względem tkanek marchwi różnego pochodzenia.

W literaturze znaleziono szereg danych dotyczących hodowli *in vitro* izolowanych korzeni niektórych odmian marchwi oraz kalusów z części kambialnej korzenia zapasowego (Bonner 1940; White 1943a; Butenko 1964; Smirnow 1970). Nie znaleziono jednak danych o warunkach hodowli *in vitro* kalusów z części nadziemnych marchwi.

MATERIAŁ I PODŁOŻA

Nasiona *Daucus carota* L., cv. 'Perfekcja' (Instytut Nasiennictwa, Poznań) sterylizowano przez 15 min. 0,1% sublimatem z 2 kroplami Tweenu na 100 ml. Po kilkakrotnym przepłukaniu sterylną wodą, nasiona wysiewano na płytki Petri'ego, do kolbek i probówek (22×180 mm) zawierających 0,6% podłoże agarowe uzupełnione 2% sacharozą. Dodatek cukru ułatwiał wykrycie zakażeń. Nasiona kiełkowały w ciemnym termostacie, w temp. 28°C. Z korzeni, które osiągnęły długość około 5 cm, pobierano eksplantaty do kultury korzeni oraz indukcji kalusów.

Hodowlę korzeni prowadzono na podłożach płynnych i stałych. W obu przypadkach zastosowano zmodyfikowaną pożywkę White'a WhO (Smirnow 1970), którą uzupełniano hydrolizatem kazeiny w ilościach 50 mg na litr — Wh1.

Zmodyfikowane podłoże White'a (Smirnow 1970) — Wh0.

Składniki	Stężenie ostateczne mg/l	Składniki	Stężenie ostateczne mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	740,0	H_3BO_3	1,4
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	288,0	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,2
Na_2SO_4	200,0	KJ	0,65
KNO_3	80,0	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025
KCl	65,0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,004
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	18,6	Sacharoza	20 000,0
$FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O$	3,5	Kwas nikotynowy	0,50
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3,6	Tiamina	0,10
		Pirydoksyna	0,10

pH podłoża wynosiło 5,0-5,1, rozlewano je po 20 ml do 50 ml kolbek. Wszystkie podłoża stosowane w tej pracy sterylizowano w autoklawie przez 15 min. przy nadciśnieniu 1 atm.

Proces izolowania korzenia dla uzyskania ich kultury przebiegał następująco: z najlepiej rosnących korzeni skiełkowanych nasion wycinano 2-3 cm fragmenty zawierające merystem wierzchołkowy i 2-3 korzonki boczne. W pasażach następnych fragmenty wycinano z części środkowej korzeni głównych zawierających korzenie boczne. Taki dobór wycinków zapewniał prawidłowe funkcjonowanie merystemów korzeniowych i otrzymanie materiału genetycznie jednorodnego (White 1943a; Smirnow 1970). Izolowane korzenie rosły w ciemnym termostacie w temp. 27+1°C. Okres jednego pasażu na podłożu płynnym trwał 7 dni, a na podłożu agarowym 20-56 dni. Długość korzeni mierzono na podkładce milimetrowej, pod binokularem.

W celu wyrośnięcia siewek i wykształcenia organów, nasiona wykiełkowane w kolbkach i probówkach przenoszono do inkubatora z 10-godzinnym okresem świetlnym. Aby uzyskać wytwarzanie kalusów, 0,8-1,5 cm fragmenty części nadziemnych 3-tygodniowych roślin umiesz-

czano w probówkach (22×180 mm) zawierających po 20 ml następujących podłoży:

a) WH0 + IAA 2 mg/l + kinetyna 0,25 mg/ — Wh2
b) WH1 + „ „ + „ „ — Wh3

Probówki wstawiano do inkubatora o ciągłym oświetleniu (1000 lux) przy stałej temp. 25 ± 1°C. Powstałe w tych warunkach kalusy (pasaż 0) przenoszono w celach porównawczych na trzy różne pożywki:

a) Wh3
b) Wh3 + wyciąg z pierzgi (P) — 2 g/l (Rennert 1965)
c) LS — Linsmaier i Skoog (1965).

Podłoże LS zawierało tę samą ilość IAA i kinetyny co podłoże Wh2. Stężenie agaru w podłożach Wh2, Wh3 i LS wynosiło 0,7%, a pH 5,6.

Pożywka Linsmaier — Skooga (1965) — LS

Składniki	Stężenie ostateczne mg/l	Składniki	Stężenie ostateczne mg/l
NH_4NO_3	1640,0	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
KNO_3	1900,0	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
H_3BO_3	6,2	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
KH_2PO_4	170,0	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
KJ	0,83	Na_2EDTA	37,3
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	tiamina	0,4
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	i-inozytol	100,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,0	sacharoza	30 000,0
$MgSO_4 \cdot 7H_4O$	370,0	agar	7 000,0

WYNIKI I DYSKUSJA

I m. 8p. wers. j.
II m. tekst na ori

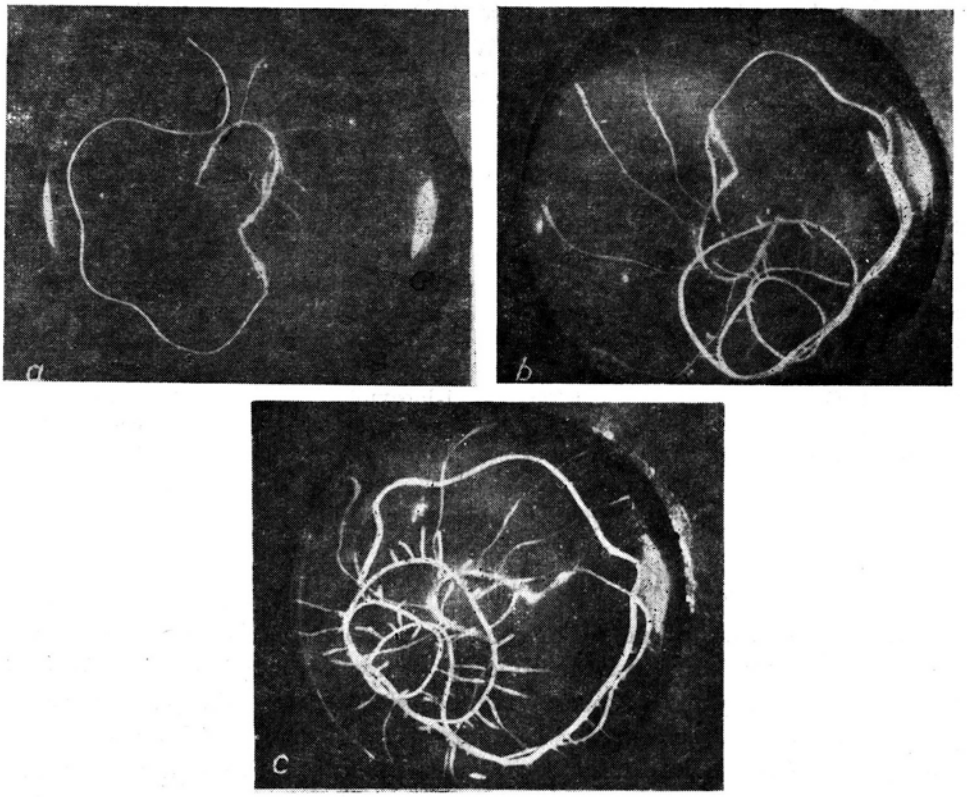
Hodowla izolowanych korzeni

Ocenę przyrostu długości korzeni na podłożu płynnym przedstawiono w tabeli 1. Po 7 dniach hodowli, długość korzeni zwiększyła się 5-krotnie. Korzenie przyrastały począwszy od pierwszego dnia po przeszczepieniu fragmentu wyjściowego. Ten przyrost netto zwiększał się w dniach następnych. Maksymalne tempo przyrostu dobowego korzeni przypadało na 5 dzień hodowli, a następnie stopniowo malało. Zgadza się to z klasycznymi doświadczeniami White'a (1943a), a także nowszymi danymi Smirnowa (1970). Jednym z czynników powodujących zwolnienie tempa wzrostu korzeni w hodowlach płynnych jest zmiana odczynu podłoża w czasie ich wzrostu. W badanym przypadku, 7 dnia hodowli wartość pH pożywki wzrastała z 5,0 do 5,7, a po dniach 14 do 6,6. Według danych literatury (Constabel 1963) zmiany odczynu podłoża związane są z wytwarzaniem i wzrostem korzonków bocznych, co zwiększa powierzchnię absorbcji.

Chociaż przyrost korzeni w płynnym podłożu jest stosunkowo szybki

i ten typ hodowli można z powodzeniem stosować w badaniach anatomii i fizjologii wzrostu, to ze względu na konieczność częstej zmiany podłoża lub ewentualnie wprowadzenia systemu aeracji, jest on mniej przydatny tam, gdzie potrzeba większej ilości materiału. Stosuje się wówczas hodowle agarowe. Pozwalają one na utrzymanie rosnących korzeni przez okres wielu tygodni w jednym pasażu.

Porównanie danych wzrostu korzeni na podłożu płynnym i stałym zawarto w tabeli 2. Ilustrację wzrostu korzeni na podłożu stałym (pasaż I) przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Wzrost korzeni marchwi odm. 'Perfekcja' na podłożu stałym (a), po 17 (b) i 23 (c) dniach hodowli; Pasaż I

Fig. 1. Carrot (cv. 'Perfekcja') root growth on agar medium (a), after: 17 (b) and 23 (c) days of culturing. Passage I

Przyrost korzeni w ciągu 20 dni hodowli na podłożu stałym, wynosił około 200 mm. Podobnie jak w podłożu płynnym, wyjściowy fragment począwszy od pasażu drugiego, przyrastał niewiele; główną masę stanowiły korzenie boczne. Jest to właściwe dla morfologicznej struktury korzeni typu wykazującego brak wyraźnej dominacji wzrostu korzenia głównego, do którego należą korzenie marchwi (Smirnow 1970).

Tabela 1—Table 1

Dobowy przyrost długości korzeni marchwi odm. 'Perfekcja' na podłożu płynnym, w mm. Pasaż I-III

Początkowa i końcowa długość korzeni wynosiła odpowiednio: 25 i 100 mm. Liczby są średnimi arytm. powtórzeń z 3 serii (3×10 pojedynczych powtórzeń)

Day increase in legnth, in mm, of carrot ('Pefrekcja') roots in liquid medium. Passages I-III

Initaial and terminal root lengths were respectively: 25 i 109 mm. Numbers are arithmetic mean values from 3 series of experiments (3×10 single samples)

Dni hodowli Days of culture	1	2	3	4	5	6	7
Przyrost netto na dobę Daily netto increase	5	8	11	16	20	15	9
Łączny przyrost netto Total netto increase	5	13	24	40	60	75	84

Tabela 2—Table 2

Porównanie wzrostu, w mm, korzeni marchwi odm. 'Perfekcja' na różnych podłożach

Liczby są średnimi arytm. powtórzeń z 3 serii (3×10 poj. prób)

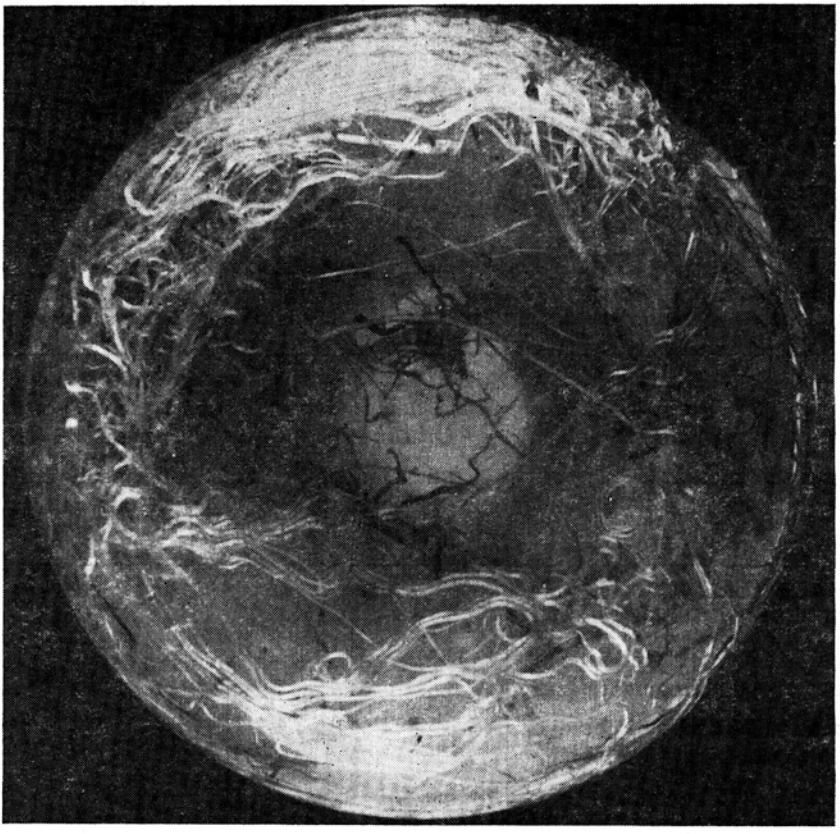
Comparison of carrot (var. 'Perfekcja') roots growth, mm, on different media

Number are mean values for 3 series of experiments (3×10 of single samples)

Parametr mierzony w mm Parameter measured in mm	Podłoże płynne po 7 dniach hodowli pasaż IV-VI Liquid medium after 7 day culture passage IV-VI	Podłoże stałe po 20 dniach hodowli pasaż III-V Solid medium after 20 day culture passage III-V
Długość początkowa Initial length	25	27
Długość fragmentu głównego Length of main fragment	54	53
Łączna długość korzeni bocznych Total length of lateral roots	70	197
Ogólna długość korzeni Total length of roots	124	250
Przyrost netto długości Netto increase of length	99	223
Liczba korzeni bocznych Number of lateral roots	7	15

O ile w 7-dniowej płynnej kulturze korzeni nie obserwowano powstawania korzeni bocznych II rzędu, to w stałej kulturze, po dłuższym czasie hodowli (4 tyg.), występowała duża liczba korzeni II i III rzędu, obserwowano także kalusowate zgrubienia w miejscach przecięcia. Nigdy nie stwierdzono przyrostu korzeni na grubość.

W porównaniu z hodowlą płynną, tempo wzrostu korzeni na podłożu stałym (tab. 2) wydaje się być wolniejsze, jednak po dłuższym okresie wzrostu (6-8 tyg.) powierzchnia i wnętrze agaru dość ściśle wypełniały się masą korzeni. Jest to szczególnie widoczne w doświadczeniu ze zwiększoną dawkę tiaminy (ryc. 2). Według danych zebranych przez Smirnowa (1970) w pożywce dla izolowanych korzeni, ilość tiaminy wynosi 0,1 mg/l. W niektórych przypadkach zwiększenie tej ilości wywiera



Ryc. 2. Korzenie marchwi odm. 'Perfekcja' na stałym podłożu zawierającym tiaminę w ilości 0,4 mg/l, po 7 tyg. wzrostu, pasaż IX

Fig. 2. Carrot (cv. 'Perfekcja') root culture on solid medium containing tiamine (0,4 mg/l), after 7 weeks of growth, passage IX

korzystny wpływ na wzrost korzeni. Dotyczy to również niektórych tkanek kalusowych (Linsmaier, Skoog 1965). W niniejszych doświadczeniach przebadano wpływ na wzrost korzeni dwu stężeń tiaminy: 0,1 i 0,4 mg/l. Wyniki przedstawiono w tabeli 3. Wskazują one, że przy wyż-

Tabela 3 — Table 3

Wpływ stężenia tiaminy na wzrost korzeni, w mm, w podłożu stałym, po 20 dniach wzrostu

Liczby są średnimi z dwu serii powtórzeń (2×15 poj. prób)

Effect of tiamine concentration on the growth of roots, in mm, in solid medium, after 20 days of culturing

Numbers are mean values for 2 series of experiments (2×15 of single samples)

Stężenie tiaminy w mg/l podłoża Cocentration of tiamine in mg/l of medium	Początkowa dł. korzeni Initial length of roots	Dł. korzeni bocznych Length of lateral roots	Ogólna dł. korzeni Total length of roots	Przyrost dł. netto Increase netto of length
0,1	26*	184	234	208
0,4	25	418	505	480

szym stężeniu tiaminy wzrost korzeni badanej odmiany marchwi jest intensywniejszy o ponad 100%. W takich warunkach, intensywny wzrost opisanego szczepu korzeni utrzymywał się bez większych zmian przez okres 2 lat.

Podstawowym warunkiem wzrostu odciętych korzeni w sztucznej hodowli jest właściwy dobór składników podłoża. Dzięki wynikom wielu prac w tym zakresie wiadomo, iż podłoże takie winno zawierać odpowiedni zestaw składników mineralnych oraz cukier (White 1943a; 1951), witaminy z grupy B — tiaminę, pirydoksynę i kwas nikotynowy (Bonner 1940, 1943), a także najczęściej pewne aminokwasy, które można zastąpić hydrolizatem kazeiny. Stało się również oczywiste, że *in vitro* intensywność wzrostu i metabolizm korzeni poszczególnych gatunków i odmian różnią się znacznie, a różnice te wynikają z warunków hodowli oraz specyficzności genetycznej (White 1943b; Street 1957; Butcher i Street 1964). Dlatego też wyprowadzenie kultury korzeni nowej odmiany wymaga sprawdzenia warunków wzrostu i ustalenie jego charakterystyki.

Porównanie wzrostu korzeni marchwi odmiany 'Perfekcja' na zastosowanym w niniejszej pracy podłożu płynnym i stałym pozwala stwierdzić, iż otrzymane przyrosty długości są zadawalające. Okres maksymalnego przyrostu i zakres zmian pH na podłożu płynnym zgadzają się z danymi literatury dla korzeni innych gatunków roślin (Constabel 1963; Bonner 1943 i White 1943a). Dotyczy to również czasu pojawia-

nia się i szybkości wzrostu korzeni bocznych, jak i braku występowania wtórnych zgrubień korzeni na obu typach podłoży (Smirnow 1970).

Jedną z cech charakterystycznych korzeni badanej tu odmiany marchwi jest wysokie zapotrzebowanie na witaminę B_1. Zapotrzebowanie kultur korzeniowych różnych gatunków i odmian roślin na tiaminę jest niejednakowe i zależy od poziomu jej syntezy w korzeniach. Dla kultur korzeniowych pomidora egzogenna tiamina jest niezbędnym warunkiem wzrostu, a jej optymalne stężenie jest bardzo niskie i wynosi 1 μg/l. Obserwowano również, że niektóre szczepy korzeni jednej i tej samej odmiany mogą różnić się między sobą wartością dawki optymalnej (Street 1969). Znane są przypadki, w których korzenie mogą rosnąć przez wiele pasaży na pożywkach pozbawionych tiaminy (Bonner i Bonner 1948). W badaniach niniejszych zwiększenie stężenia tiaminy ze 100 do 400 μg/l silnie stymuluje wzrost wyizolowanych korzeni marchwi odmiany 'Perfekcja'. Otrzymane w tych warunkach tempo wzrostu kultury na podłożu agarowym pozwala na uzyskanie obfitej masy korzeni po okresie 7-8 tygodni oraz utrzymuje się nadal na tym samym poziomie.

HODOWLA TKANEK KALUSOWYCH

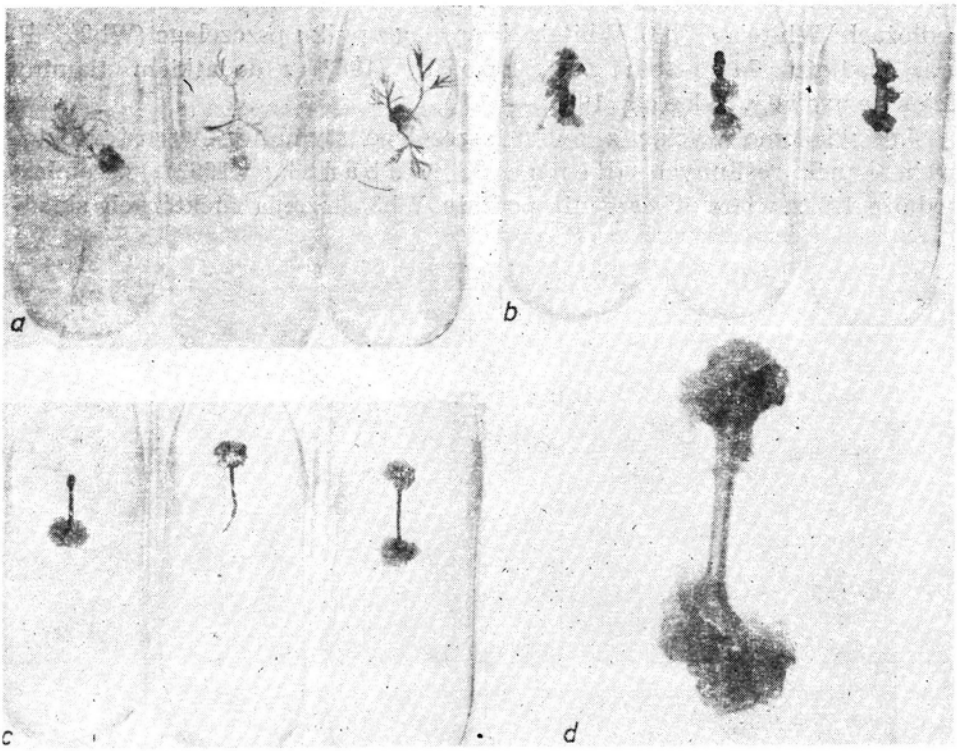
1. Tworzenie kalusów na fragmentach różnych organów

Powstawanie kalusów w pierwszej fazie przejawiało się charakterystycznymi zgrubieniami fragmentu macierzystego, a następnie pojawiała się w miejscu zgrubienia masa tkanki kalusowej. Kalusy tworzyły się bądź na jednym, bądź na obu końcach fragmentu, w niektórych przypadkach kalus pokrywał cały fragment macierzysty. Liczba i wielkość kalusów powstających na poszczególnych wycinkach były różne. Najsłabsze tworzenie kalusów obserwowano na blaszkach liściowych i cieniutkich korzonkach. Nie uzyskano stymulacji przez dodanie do podłoży hydrolizatu kazeiny. Wręcz przeciwnie, wytwarzanie kalusów na podłożach z hydrolizatem było słabsze. Najobfitsze tworzenie kalusów występowało na fragmentach hypokotyli (ryc. 3).

2. Wzrost we wczesnym okresie kultury, pasaż I-VI

Kalusy oddzielone od fragmentów macierzystych przeniesiono na podłoże White'a (Wh3, pasaż I). Pod względem wyglądu zewnętrznego tkanki pochodzące z różnych organów prawie nie różniły się między sobą. Przeciętne przyrosty świeżych mas tkankowych w tym pasażu były podobne u wszystkich rodzajów kalusów (tab. 4). Stosunkowo najsłabiej rosły kalusy korzeniowe i liściowe.

Ze względu na słabe w tych warunkach tempo wzrostu i suchą struk-



Ryc. 3. Formowanie się kalusów na fragmentach organów marchwi odm. 'Perfekcja' po 4 tygodniach: a — liść; b — liścień; c — ogonek liściowy; d — hypokotyl
Fig. 3. Callus tissues forming on the fragments of carrot (cv. 'Perfekcja)' organs, after 4 weeks: a — leaf; b — cotyledon; c — leaf petiole; d — hypocotyl

Tabela 4 — Table 4

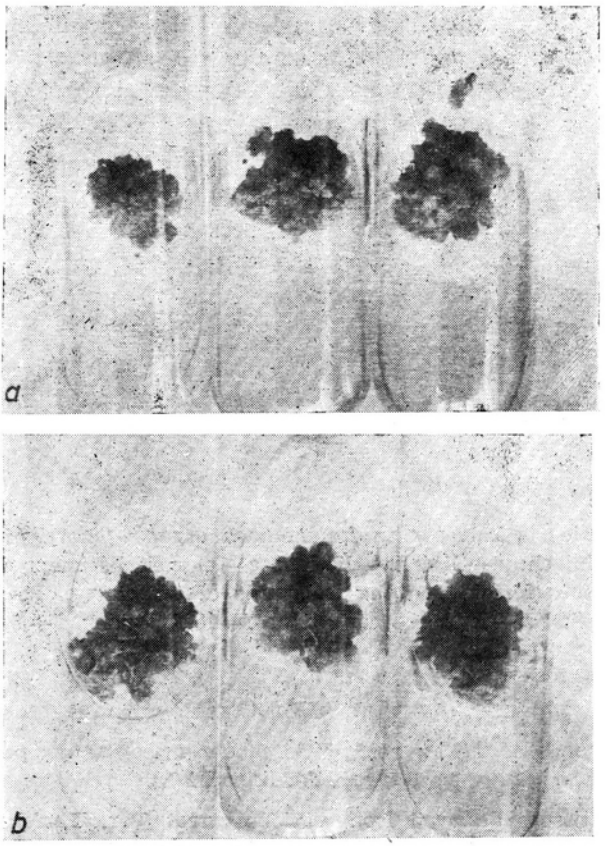
Wzrost świeżych mas tkanek z różnych organów marchwi na podłożu White'a, po 6 tyg. hodowli, pasaż I

Fresh matter of tissues derieved from various carrot (var. 'Perfekcja') organs on White medium after 6 weeks of culturing, passage I

Pochodzenie tkanki Tissue origin	Ogólna liczba eksplantatów Total number of explantants	Średni ciężar Mean weight mg
Blaszka liściowa — Leaf blade	16	937
Liścień — Cotyledon	28	1089
Ogonek liściowy — Petiole	20	1037
Hypokotyl — Hypocotyl	21	1035
Korzeń — Root	12	793

turę tkanek, w pasażach następnych badano wzrost na trzech różnych podłożach: White'a (Wh3), White'a + wyciąg z pyłku pszczelego (Wh3 + P) oraz podłożu Murashige-Skooga (1962) z dodatkiem tiaminy (Linsamaier, Skoog 1965) — (LS).

Jak wiadomo wyciąg z pyłku pszczelego stymuluje wzrost niektórych tkanek roślinnych (Rennert, Gubański 1962), natomiast podłoże LS zawiera wyższe niż podłoże Wh3 stężenia niektórych składników mineralnych oraz azot w postaci amonowej. Kalusy użyte w tych doświadczeniach pochodziły z pasażu II i III. Jest to więc okres, w którym nie nastąpiła jeszcze adaptacja tkanek do nowych warunków i ich stabilizacja. W okresie tym (tab. 5) najsilniejszy efekt wywoływał wyciąg z pyłku pszczelego. Stopień przyspieszenia wzrostu zależał od pochodzenia tkanki. Najsłabiej zareagowały kalusy korzeniowe. Wszystkie



Ryc. 4. 4-tygodniowe kalusy z liścieni na podłożu White'a (Wh3) z dodatkiem wyciągu pyłkowego (b) lub bez (a)

Fig. 4. 4-week old cotyledon tissues on White (Wh3) medium with (b), or without bee bread extract (a)

Tabela 5 — Table 5

Porównanie wzrostu kalusów na różnych podłożach, w hodowli 6-tygodniowej, pasaż III-V

Comparison of callus growth on various media, in 6-week-old culture, passage III-V

Pochodzenie tkanki Tissue's origin	Podłoże Medium	Liczba tkanek Number	Śr. ciężar Av. wt. mg	%	Cechy makroskopowe tkanek Macroscopic characters of tissues
1	2	3	4	5	6
Blaszka liściowa Leaf blade	Wh3	35	750	100	b. zielono-żółta, s. dobra (colour greenish-yellow, good structure)
	Wh3+P	37	1196	160	b. zielono-żółta, s. bardzo dobra, kilka korzeni (colour greenish-yellow, very good structure, a few roots)
	LS	26	730	97	b. ciemno-zielona, brunatna w większości korzeni i liści (colour dark green, brown; majority of roots and leaves)
Liścień Cotyledon	Wh3	23	793	100	b. żółto-brunatna, s. dość sucha (colour yellowish-brown; structure quite dry)
	Wh3+P	21	1345	169	b. zielona lub zielono-żółta, s. dobra, kilka korzeni (colour green or greenish-yellow; good structure, a few roots)
	LS	17	600	75	b. brunatna, fragmenty ciemnozielone, s. sucha, organogenezy brak (colour brown, dark-green fragments; good structure, lack of organogenese)
Ogonek liściowy Petiole	Wh3	38	848	100	b. zielono-żółta lub brunatna, s. dość dobra lub sucha (colour greenish-yellow or brown; quite good struct or dry one
	Wh3+P	38	1450	171	b. zielona lub żółto-zielona, s. dobra, kilka korzeni (colour green or yellowish-green; good structure, a few roots)
	LS	26	903	106	b. ciemno-zielona, brunatna, s. dobra, mniej liści, większość korzeni (colour dark-green, brown; good structure, majority of roots, less leaves)

1	2	3	4	5	6
Hypokotyl Hypocotyl	Wh3	40	956	100	b. zielono-żółta lub brunatno-zielona s. dość dobra lub sucha (colour greenish-yellow or brownish-green; quite good structure or dry one)
	Wh3+P	38	1450	171	b. zielona lub żółto-zielona, s. dobra, kilka korzeni (colour green or yellowish-green, good structure, a few roots)
	LS	26	903	106	b. ciemno-zielona, brunatna, s. dobra, mniej liści, większość korzeni (colour dark-green, or brown; good structure, majority of roots, less leaves)
Korzeń Root	Wh3	26	980	100	b. zielono-żółta, kilka korzeni (colour greenish-yellow, a few roots)
	Wh3+P	26	1230	125	b. żółto-zielona, s. dobra, dużo korzeni (colour yellowish-green, good structure, plant of roots)
	LS	26	875	89	b. ciemnozielona, s. dość sucha, brak korzeni (colour dark-green, quite dry structure, lack of roots)

b — barwa (colour); s — struktura (structure).

typy kalusów na podłożu z P wytwarzały korzenie wykazując równocześnie poprawę struktury. Przyrosty świeżych mas tkanek na podłożu LS były tego samego rzędu co na podłożu Wh3. Jednakże tkanki na podłożu LS były bardzo jędrne i zielone. U większości typów tkanek na tym podłożu obserwowano indukcję organów (korzenie i liście), wyjątek stanowiły kalusy liścieni. Wzrost wszystkich uzyskanych typów tkanek kontynuowano na podłożach Wh3 i LS. Dalsze obserwacje wykonano po 15-miesięcznym okresie hodowli, gdy nastąpiła już stabilizacja szczepów tkankowych.

3. Charakterystyka wzrostu szczepów po ich stabilizacji, pasaż XII-XIII.

Utrwalone w hodowli *in vitro* tkanki wykazały zróżnicowanie tempa przyrostu świeżych mas w zależności od ich pochodzenia i podłoża. Na podłożu LS najlepiej rosną kalusy z ogonków liściowych, osiągając po 35 dniach hodowli masę 3 g, oraz kalusy hypokotyli, osiągające masę 2,15 g. Najsłabiej na tym podłożu rosną kalusy korzeniowe (1,5 g, ryc. 5).

Na podłożu Wh3 natomiast, kalusy korzeniowe wykazują najlepszy wzrost, przesuwając się z pozycji ostatniej na pierwszą w stosunku do

pozostałych tkanek. Najsłabiej na tym podłożu rosną kalusy liścieni i hypokotyli (ryc. 6).

Wzrost wszystkich szczepów tkankowych na podłożu Wh3 jest ogólnie słabszy w porównaniu z ich wzrostem na podłożu LS, jednak procentowa zawartość suchych mas u tych tkanek jest wyższa (tab. 6). Stwierdzono, że utrwalone szczepy tkanek marchwi wykazały lepszy wzrost na podłożu LS w porównaniu z ich wzrostem na tym podłożu we wczesnym okresie hodowli. W ustalonych wynikiem niniejszej pracy warunkach wyizolowane kultury tkankowe rosną dość intensywnie bez oznak różnicowania, a tempo wzrostu utrzymuje się nadal bez większych zmian.

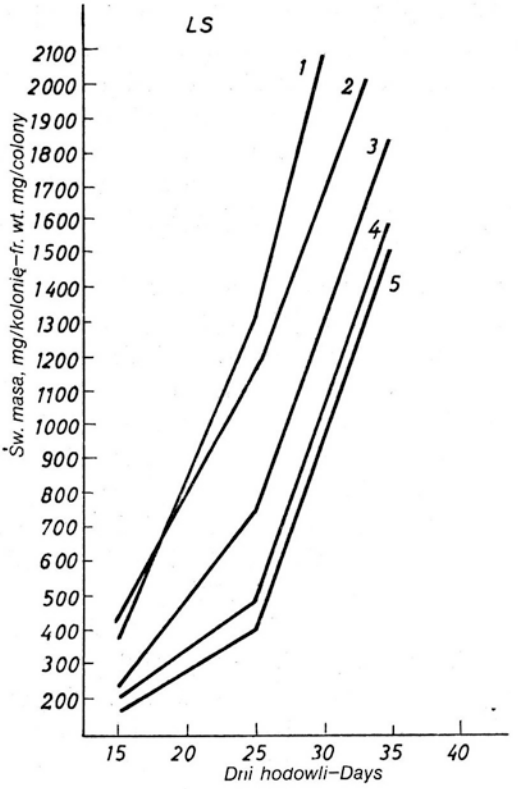
Istnieje wiele danych na temat wymagań odżywczych i warunków hodowli tkanek i organów różnych roślin. Większość badań nad kulturą kalusów marchwi, dotyczy tkanek pochodzących z korzenia zapasowego, przy czym podłoże hodowli jest tu najczęściej uzupełniane mlekiem kokosowym (Butenko 1964).

W celu otrzymania kultur kalusowych z fragmentów różnych organów marchwi odmiany 'Perfekcja', wykorzystano wstępnie zmodyfikowany zestaw składników odżywczych White'a stosowany dla hodowli tkanek innych odmian tej rośliny (White 1939; Butenko 1964; Smirnow 1970). Zestaw ten uzupełniono hydrolizatem kazeiny oraz IAA i kinetyną (Wh3). Ze względu na niezadowalający w tych warunkach wzrost, podłoże to wzbogacono wyciągiem z pyłku pszczelego (P) w miejsce stosowanego zazwyczaj mleka kokosowego. P stymulował wzrost wszystkich typów tkanek marchwi badanej odmiany, choć stymulacja ta nie przekraczała wartości 70% (tab. 5). Z naszych wcześniejszych badań wynika, że P oprócz niespecyficznych stymulatorów wzrostu kultur tkankowych *in vitro*, zawiera czynniki pobudzające wzrost wydłużeniowy (Rennert 1968) oraz wykazuje aktywność kinetynopodobną odpowiadającą aktywności 0,03 mg/l kinetyny, przy stężeniu 4 g P/l podłoża (Rennert 1968, dane nie publikowane).

Wśród składników mineralnych podłoża White'a (Wh3) znajdują się wyłącznie azotany jako źródło azotu nieorganicznego, a ilości azotu, potasu i fosforu wydają się dość niskie (Nitsch i Nitsch 1957). Według niektórych autorów (Steward, Bidwell, Yemm 1958; Shantz i Steward 1959), zamiana azotanów na sole amonowe oraz zwiększenie ilości fosforu i potasu stymuluje wzrost tkanek marchwi i ziemniaka na podłożu z mlekiem kokosowym. Odpowiedni pod tym względem jest skład podłoża Murashige i Skooga (1962) opracowany dla tkanek tytoniu. Podłoże to w modyfikacji Linsmaier i Skooga (1965) jest wykorzystywane z powodzeniem także dla tkanek innych gatunków roślin (Maciejewska-Potapczykowa, Rennert, Milewska 1972).

We wczesnym okresie hodowli (pasaż I-V), intensywność wzrostu ka-

lusów z organów marchwi odmiany 'Perfekcja' na podłożu Linsmaier i Skooga nie różniła się znacznie od ich wzrostu na podłożu White'a. Jednakże cechą charakterystyczną wszystkich prawie tkanek rosnących na pożywce LS była zwarta, jędrna struktura oraz wyraźnie zielona barwa bez żadnych objawów zbrunatnień. Wskazywałoby to na lepsze odżywienie tkanek, mimo ich stosunkowo wolnego tempa wzrostu. Podłoże LS



Ryc. 5. Przyrost świeżej masy tkanek w hodowli *in vitro* na podłożu LS, w zależności od ich pochodzenia

1 — ogonek liściowy; *2* — hypokotyl; *3* — liść; *4* — liścień; *5* — korzeń

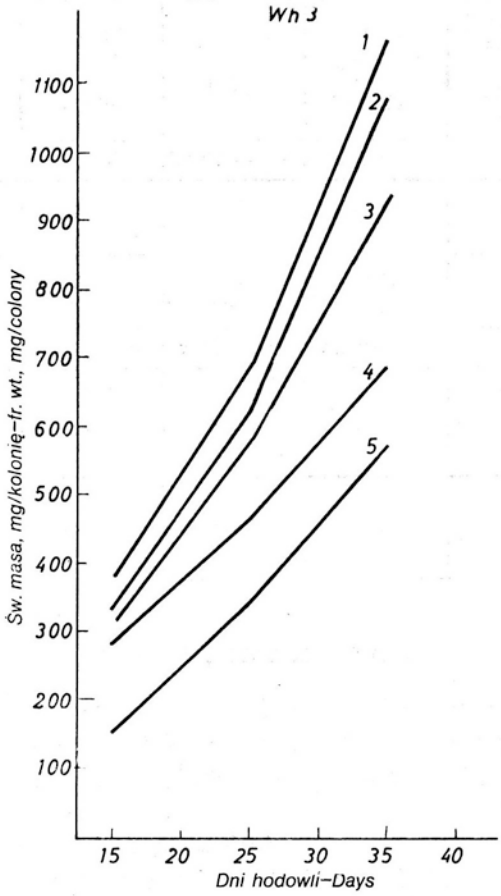
Fig. 5. Increment of fresh matter of tissues cultured *in vitro* on medium LS, in dependence to their origin

1 — petiole; *2* — hypocotyl; *3* — leaf; *4* — cotyledon; *5* — root

wykazywało również wyraźne działanie organotwórcze, które znikało stopniowo w miarę upływu czasu. W tym wczesnym okresie hodowli najlepszy wpływ na wzrost tkanek wykazywał wyciąg pyłkowy. Efekt ten wiąże się przypuszczalnie z działaniem niespecyficznych stymulatorów wzrostu P, gdyż ilości IAA i kinetyny (2 i 0,25 mg/l), znajdujące się w podłożu podstawowym wydają się być dość wysokie. W doświad-

czeniach z tkanką kalusową korzenia zapasowego marchwi odmiany 'Nantejska' Butenko (1964) stosowała 0,05 mg/l IAA lub 0,1-1 mg/l 2,4-D, natomiast kinetyna w stężeniu 1 mg/l wykazywała działanie hamujące.

Jest ciekawe, że o ile w okresie adaptacji tkanek do nowych warunków (pierwsze pasaże) nie obserwowano znaczniejszego zróżnicowania in-



Ryc. 6. Przyrost świeżej masy tkanek w hodowli *in vitro* na podłożu Wh3 w zależności od ich pochodzenia

1 — korzeń; *2* — ogonek liściowy; *3* — liść; *4* — hypokotyl; *5* — liścień

Fig. 6. Increment of fresh matter of tissues cultured *in vitro* on White medium (Wh3), in dependence to their origin

1 — root; *2* — petiole; *3* — leaf; *4* — hypocotyl; *5* — cotyledon

tensywności wzrostu kalusów zależnie od ich pochodzenia, to zróżnicowanie takie wystąpiło dość wyraźnie po utrwaleniu się szczepów (tab. 6). W tym też okresie hodowli, podłoże LS okazało się bardziej korzystne w porównaniu z podłożem Wh3.

Tabela 6 — Table 6

Porównanie świeżych i suchych mas tkanek 35-dniowych (mg/kolonię), na dwu różnych podłożach, pasaż XII-XIII. Liczby są średnimi z dwu serii (2×10 poj. prób).

Comparison of fresh and dry matters of 35-day-old tissues growing on two different media, passage XII-XIII. Number are mean values from 2 series of experiments (2×10 of single samples)

Podłoże Medium	Pochodzenie tkanki Tissue's origin	Blaszka liściowa Leaf blade	Liścień Cotyledon	Ogonek liściowy Petiole	Hypokotyl Hypocotyl	Korzeń Root
Świeża masa — Fresh weight						
Wh3	mg	930	570	1080	690	1160
	%	100	100	100	100	100
LS	mg	1840	1580	3000	2160	1510
	%	198	277	277	313	130
Sucha masa — Dry weight						
Wh3	mg	97	60	130	94	106
	% św. masy % fr. wt.	10,6	11,5	11,0	14,0	9,5
LS		158	137	196	174	148
	% św. masy % fr. wt.	8,7	8,8	7,0	8,2	10,1

STRESZCZENIE I WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wyprowadzono stałą kulturę korzeni oraz tkanek kalusowych z liści, ogonów liściowych, liścieni hypokotyli i korzeni marchwi, powszechnie uprawianej w kraju odmiany 'Perfekcja'.

Porównano dynamikę wzrostu izolowanych korzeni na podłożu płynnym i stałym. W doświadczeniach wykazano wysokie zapotrzebowanie na tiaminę korzeni badanej tu odmiany. Otrzymane w zastosowanych warunkach tempo wzrostu kultury na podłożu agarowym, pozwala na uzyskanie obfitej masy korzeni po okresie 7-8 tygodniowym.

W hodowli tkanek kalusowych zastosowano zmodyfikowane podłoże White'a (Wh3), podłoże Linsmaiera i Skooga (LS) oraz wyciąg z pyłku pszczelego jako naturalny stymulator o złożonym działaniu.

We wczesnym okresie hodowli najkorzystniejszy wpływ na wzrost tkanek wykazał wyciąg pyłkowy. Pozytywny efekt podłoża LS na badane tkanki wyrażał się znaczną poprawą ich struktury. Pojawiały się na nim również liczne korzenie i liście.

W okresie adaptacji tkanek do nowych warunków (pierwsze pasaże) nie obserwowano znaczniejszego zróżnicowania intensywności wzrostu kalusów w zależności od ich pochodzenia. Zróżnicowanie takie wystąpiło dość wyraźnie dopiero po utrwaleniu się szczepów (pasaż XII-XIII). W tym późniejszym okresie hodowli podłoże LS okazało się znacznie korzystniejsze w porównaniu z podłożem Wh3.

SUMMARY

In result of carried experiments solid culture of roots and culture of callus tissues from leaves, petioles, hypocotyles, cotyledones and culture of carrot's roots of commonly cultivated variety 'Perfekcja' in Poland were obtained.

The dynamics of increments of isolated roots on solid and liquid media were compared. In course of experiments the high demand for thiamine in roots of tested variety was proved. The rate of increment of culture on agar medium allows to obtain in applied conditions high masses of roots after 7-8 week's period.

In culture of callus tissues applied modificated White's medium (Wh3), Linsmeier and Skoog's medium (LS) and also bee bread extract as a natural stimulator of complexed activity were applied. The bee bread extract appeared to be most effective in the early time of cultivation.

Positive effects of LS medium on investigated tissues was proved by significant improvement of their structure.

During tissue's adaptation to new conditions (first passage) no significant differentiation of intensity of callus growth in dependence to their origin were observed.

The differentiation of this type appeared quite clear only after strain's establishment (passages XII-XIII).

In the later period of cultivation on LS medium appeared to be much more effective then on medium Wh3.

LITERATURA

Bonner J., 1940. Amer. J. Bot. 27: 692-701.

Bonner J., 1943. Bull. Torrey Botan. Club 70: 184-189.

Bonner J., Bonner H., 1948. Vitamins Hormones 6: 225-275.

Butenko R. G., 1964. Kultura izolirowannych tkaniej i fizjołogia morfogienieza rastienij. Akad. Nauk, SSSR.

Butcher D. N., Street H. E., 1964. Bot. Rev. 30: 513-586.

Constabel F., 1963. Planta 59: 330-337.

Linsmaier E. M., Skoog F., 1965. Physiol. Plant. 18: 100-127.

Maciejewska-Potapczykowa W., Rennert A., Milewska E., 1972. Acta Soc. Bot. Pol. 41 (3): 329-339.

Murashige T., Skoog F., 1962. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nitsch J. P., Nitsch C., 1957. Amer. J. Bot. 44: 555-564.

Rennert A., Gubański M., 1962. Naturwiss. 17: 404.

Rennert A., 1965. Zesz. Nauk. UŁ, s. II, 18: 135-145.

Rennert A., 1968. Zesz. Nauk. UŁ, s II, 30: 69-80.

Shantz E. M., Steward F. C., 1959. Ann. Bot. (London) 23: 371-390.

Smirnow A. M., 1970. Rost i metabolizm izolirowannych korniej w sterilnoj kulturie. Izd. „Nauka", Moskwa.
Steward F. C., Bidwell R. G. S., Yemm E. W., 1958. J. Exp. Bot. 9: 11-51.
Street H. E., 1957 [W:] F. C. Steward, 1969. „Plant Physiology" Ac. Press. vol VB: 55-62.
White P. R. 1939. Am. J. Bot. 26: 59-64.
White P. R. 1940. Am. J. Bot. 27: 811-821.
White P. R. 1943a. A handbook of plant tissue culture. Jacques Cattell Press, Lancaster.
White P. R. 1943b. Growth, 7: 53-65.