

Inicjacja kalusa i ryzogenezy na wycinkach hypokotyli *Cucumis sativus* L.

B. WOJCIECHOWSKA, D. CZUPRYŃSKA, K. NOWAK, A. CIEPLIŃSKI

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

(Otrzymano dn. 15.06.1981)

B. Wojciechowska, D. Czupryńska, K. Nowak, A. Ciepliński
(Department of Plant Anatomy and Cytology, Silesian University, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice,
Poland). Acta Agrobotanica 36 (1-2): 67-81, 1983.

Initiation of callus and rhizogenesis of Cucumis sativus L. hypocotyl explants

Abstract

Hypocotyl fragments of *Cucumis sativus* L. were grown on two basic media: Linsmaier-Skoog's (1964) and White's (1943) modified by Street and McGregor (1952). These media were enriched by addition of some growth regulators (NAA, IAA, 2,4-D) in combination with kinetin. White's basic medium is not suitable for callus culture and for rhizogenesis of cucumber hypocotyls. Linsmaier and Skoog's medium was most suitable for growth of callus. After enrichment of the media with IAA, NAA and 2,4-D differences in the degree of taking root by the explants and callus formation were observed.

WSTĘP

O inicjacji, a następnie namnażaniu kalusa bądź ukierunkowaniu procesów morfogenetycznych w głównej mierze decydują składniki podstawowego podłoża i właściwa równowaga między endogennymi i egzogennymi substancjami wzrostowymi (Skoog i Miller, 1957; Potapczuk, 1971; Murashige, 1973).

Dotyczy to również roślin z rodziny *Cucurbitaceae*. Fadia i Mehta (1972, 1975) zastosowały do hodowli kalusa *Cucumis melo* pożywkę White'a wzbogaconą sacharozą (2%), mlekiem kokosowym (10%), hydrolizatem kazeiny (300 mg/dm³) oraz NAA (0,1 mg/dm³).

Jelaska (1974) użyła pożywek Helera oraz Murashige i Skooga uzupełnionych 2,4-D i NAA w stężeniu 10⁻⁵ — 10⁻⁹ M badając wpływ tych substancji na rozwój korzeni na izolowanych fragmentach hypokotyli dyni. Nowak (1978) hodowała tkankę kalusową z liścieni i z hypokotyli dyni (*Cucurbita*

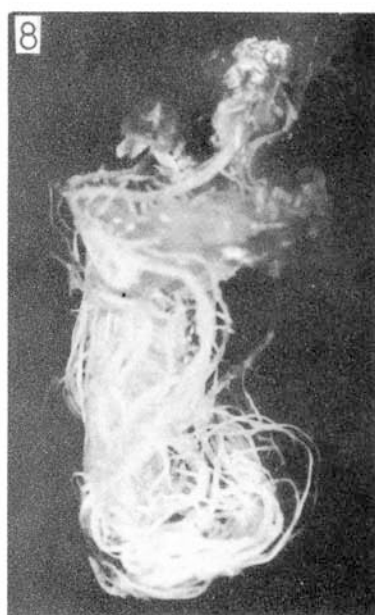
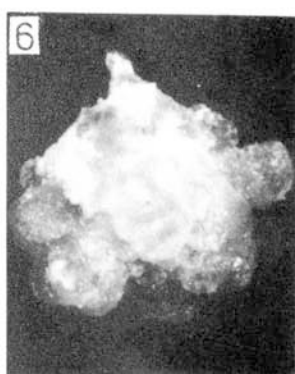
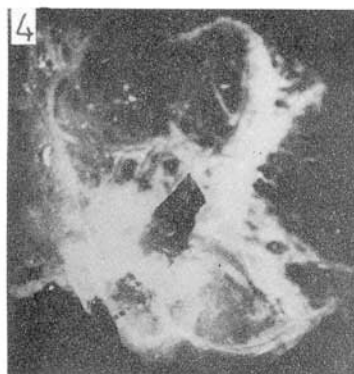
maxima Duch. odmiany 'Bambino') stosując 2 pożywki: Murashige i Skooga oraz Linsmaier i Skooga z dodatkiem 2,4-D. W o j c i e c h o w s k a i in. (1980) stwierdzają, że intensywnie zielono zabarwiony kalus *Bryonia dioica* Jacq. można uzyskać na pożywce Linsmaier i Skooga, zawierającej 3 mg/dm³ 2,4-D. Przy podwyższonym stężeniu tej auksyny zachodziła organogeneza. Prawidłowy rozwój roślin był zapewniony przez wprowadzenie do pożywki ostatniego pasażu 2 mg/dm³ IAA zamiast 2,4-D. M a c i e j e w s k a-P o t a p c z y k o w a i in. (1972) również użyły pożywki Linsmaier i Skooga wzbogaconej IAA (2,0 mg/dm³) i kinetyną (2,2 mg/dm³) do hodowli szczytowych fragmentów łodyg i pąków kwiatowych ogórka.

Celem naszej pracy było przeanalizowanie wzrostu i rozwoju kalusa oraz ryzogenezy na wycinkach hypokotylowych *Cucumis sativus* L., hodowanych na dwóch pożywkach (White'a i Linsmaier i Skooga), wzbogacanych różnymi stężeniami regulatorów wzrostu.

MATERIAŁ I METODY

Nasiona ogórka *Cucumis sativus* L. czystej linii żeńskiej (l. ż.) M₆ otrzymano z Zakładu Hodowli i Genetyki Instytutu Warzywnictwa w Regulach, woj. warszawskie.

Do kiełkowania nasion zastosowano próbki zawierające po 10 ml pożywki agarowej (7 g/dm³) wzbogaconej glukozą (20 g/dm³). Nasiona moczoно w wodzie wodociągowej w ciągu godziny, sterylizowano w 0,1% roztworze HgCl₂ przez 5 minut, kilkakrotnie płukano w wodzie destylowanej i umieszczano na 10-14 dni w ciemności, w temperaturze około 30°C. Sterylne siewki, o długości hypokotyli około 5 cm, przenoszono na 20 godz. do pomieszczenia o oświetleniu ciągłym (światło białe jarzeniowe, ± 1000 lux). Eksplantaty wycinano ze środkowych części hypokotyli i przenoszono na pożywkę. Użyto 2 pożywki podstawowe: W h i t e ' a (1943) zmodyfikowaną przez S t r e e t a i M c G r e g o r a (1952), którą uzupełniono różnymi stężeniami NAA lub 2,4-D, przy stałym poziomie kinetyny (0,25 mg/dm³) oraz pożywkę L i n s m a i e r i S k o o g a (1964) z NAA, 2,4-D, IAA i kinetyną w stężeniu 0,25-2,75 mg/dm³. Podłoże doprowadzano do pH 5,5 po czym uzupełniano agarem i rozlewano po 25 ml do probówek. Sterylizowano w autoklawie przez 20 minut pod ciśnieniem 0,8 atmosfery. Eksplantaty hodowano w temperaturze ± 26°C w oświetleniu omówionym wyżej. Dla każdej modyfikacji pożywki przygotowano po 10 probówek zawierających po 1 wycinku z hypokotyli. Po trzech tygodniach wykonano I pasaż na pożywkę Linsmaier i Skooga. Masa wyszczepianego kalusa wynosiła 100-300 mg. Przyrosty świeżej i suchej masy podano w gramach, a uwodnienie kalusa w procentach. Zużycie pożywki, w przeliczeniu na 1 g wyprodukowanej tkanki, obliczano wg wzoru:



- Rys. 1. Kultura pierwotna. Eksplantat z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka White'a zmodyfikowana NAA 0,5 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow. 2 ×
- Fig. 1. Primary culture. Explant from *Cucumis sativus* L. hypocotyl (f.l.) M₆. White's medium modified with NAA — 0.5 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 2. Eksplantat z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka White'a zmodyfikowana 2,4-D 0,5 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow 2 ×
- Fig. 2. Explant from *Cucumis sativus* L. hypocotyl (f.l.) M₆. White's medium modified with 2,4-D — 0.5 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 3. Eksplantat z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka White'a zmodyfikowana 2,4-D 1,0 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow 2 ×
- Fig. 3. Explant from *Cucumis sativus* L. hypocotyl (f.l.) M₆. White's medium modified with 2,4-D — 1.0 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 4. Nietypowy wzrost korzeni na wycinku z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka Linsmaier i Skooga NAA 0,1 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow. 2 ×
- Fig. 4. Nontypical root growth on segment of *Cucumis sativus* L. hypocotyl (f.l.) M₆. Linsmaier and Skoog medium, NAA — 0.1 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 5. Kalus całkowicie pokrywający pierwotnie dobrze widoczne zawiązki korzeni. Pożywka Linsmaier i Skooga, NAA 1,0 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow. 2 ×
- Fig. 5. Callus covering completely primarily well visible root primordia. Linsmaier and Skoog medium, NAA — 1.0 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 6. Kalus na eksplantacie z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka Linsmaier i Skooga, 2,4-D 1,0 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow. 2 ×
- Fig. 6. Callus on *Cucumis sativus* L. hypocotyl explant (f.l.) M₆. Linsmaier and Skoog medium, 2,4-D — 1.0 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× 2)
- Rys. 7. Liczne korzenie boczne na silnie rozwiniętych korzeniach. Wycinek z hypocotyła *Cucumis sativus* L. l. ż. M₆. Pożywka Linsmaier i Skooga 2,0 mg/dm³ IAA, 2,45 mg/dm³ kinetyny. (Wielkość naturalna)
- Fig. 7. Numerous lateral roots on well developed roots. Segment of *Cucumis sativus* L. hypocotyl (f.l.) M₆. Linsmaier and Skoog medium, IAA — 2.0 mg/dm³, kinetin — 2.45 mg/dm³. (natural size)
- Rys. 8. Forma teratologiczna. Pożywka Linsmaier i Skooga, 2,4-D 0,1 mg/dm³, kinetyna 0,25 mg/dm³. Pow. ± 4 ×
- Fig. 8. Teratological form. Linsmaier and Skoog medium, 2,4-D — 0.1 mg/dm³, kinetin — 0.25 mg/dm³. (× ca 4)

$$ZP = \frac{A_p - A_k}{B_k - B_p},$$

ZP — zużycie pożywki,

A_p — początkowy ciężar pożywki (g),

A_k — końcowy ciężar pożywki (g),

B_p — początkowa masa tkanki (g),

B_k — końcowa masa tkanki (g).

Terminem zużycie pożywki obejmujemy zarówno wykorzystanie składu podłoża przez rozwijającą się tkankę, jak również jego wysychanie w czasie hodowli. Zarówno zużycie pożywki jak i zdolności ryzogeniczne badano po 5 tygodniach hodowli (I pasaż) i po dalszych 5 tygodniach (II pasaż). Ukorzenie w procentach obliczano przez porównanie liczby eksplantatów, na których pojawiły się korzenie w stosunku do ogólnej liczby badanych eksplantatów.

W celu ustalenia okresu najintensywniejszego wzrostu tkanki w stosowanych uprzednio warunkach, wyprowadzono kultury pierwotne, a następnie kalus I pasażu. Kalus ten hodowano przez 6 tygodni, dokonując pomiaru świeżej masy trzykrotnie. Użyto pożywki Linsmaier i Skooga wzbogaconej NAA (1,0 mg/dm³) lub 2,4-D (1,0 mg/dm³) i kinetyną (0,25 mg/dm³).

WYNIKI I DISKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zmodyfikowana pożywka White'a okazała się nieprzydatna zarówno dla rozwoju kalusa, jak i ukorzenia eksplantatów. Nie zaobserwowano także znaczących różnic w działaniu NAA i 2,4-D. Tylko przy najniższych stężeniach (0,1 mg/dm³) dochodziło do inicjacji licznych ale drobnych korzeni. W przypadku zastosowania NAA procent ukorzenionych eksplantatów wynosił 75, a 60% po wprowadzeniu do pożywki 2,4-D. Indukujący wpływ niskich stężeń 2,4-D na ryzogenezę obserwowała również J e l a s k a (1974) na hypokotylach *Cucurbita pepo* L., oraz C h i n i S c o t t (1977) na *Triticum aestivum* i *Hordeum vulgare* L. W naszych doświadczeniach tylko przy stężeniu 0,5 mg/dm³ NAA lub 2,4-D na grudkach kalusa pojawił się biały nalot, wskazujący na procesy podziałowe i tworzenie stref proliferacji (rys. 1, 2). Zwiększanie stężenia 2,4-D powodowało ograniczanie wzrostu kalusa aż do prawie całkowitej jego inhibicji (rys. 3) i prowadziło do zmiany zabarwienia eksplantatów. O inhibicji syntezy chlorofilów w obecności 2,4-D donosi między innymi M a l e p s z y (1977).

Natomiast na pożywce Linsmaier i Skooga uzyskano wyniki wskazujące na różnice w aktywności użytych auksyn (tab. 1). Wprowadzenie do pożywek NAA wpłynęło na intensyfikację ryzogenezy, przy czym podwyższenie stężenia (1,0 i 2,0 mg/dm³) okazało się skorelowane z inicjacją zawiązków korzeni; korzenie

Tabela 1 – Table 1

Kultura pierwotna eksplantatów hypokotyli *Cucumis sativus* L. po 3 tygodniach hodowli. Pożywka Linsmaier i Skooga z dodatkiem różnych stężeń IAA, NAA, 2,4-D i kinetyny

Primary culture of hypocotyl explants from *Cucumis sativus* L. after 3 weeks of culture. Linsmaier and Skoog medium with various concentrations of IAA, NAA, 2,4-D and kinetin

Oznaczenie pożywki Medium	Rodzaj auksyny i stężenie Kind of auxin and concentration mg/dm ³	Stężenie kinetyny Kinetin concentration mg/dm ³	Ryzogeneza eksplantatów Rhizogenesis of explants		Charakterystyka kalusa Callus characteristic	
			ukorzenie eksplantatów rooting of explants %	opis korzeni i eksplantatów description of roots and explants	wizualna ocena wzrostu visual evaluation of growth	barwa kalusa colour
L-S-1	NAA = 0,1	0,25	73,0	długie, na powierzchni pożywki long, on surface of medium	słaby weak	żółto-zielona + biała yellow-green + white
L-S-2	NAA = 0,5	0,25	60,0	długie, krótsze niż L-S-1, otaczają kalus; nie zagłębiają się w po- żywkę long, shorter than on L-S-1 sur- rounding callus, do not penetrate into medium	słaby weak	żółto-zielona yellow-green
L-S-3	NAA = 1,0	0,25	75,0	jeszcze krótsze niż na L-S-2, oto- czone kalusem, nie przenikające do pożywki still shorter than on L-S-2 sur- rounded with callus do not penetrate into medium	dobry good	zielona + jasnozielona green + light green
L-S-4	NAA = 2,0	0,25	81,8	ukryte wśród kalusa hidden amidst callus	bardzo dobry very good	żółta + jasnozielona yellow + light green

L-S-5	2,4-D = 0,1	0,25	83,3	na powierzchni pożywki on surface of medium	słaby weak	żółto-zielona yellowish-green
L-S-6	2,4-D = 0,5	0,25	0,0	eksplantaty żółkną i zamierają explants turn yellow and die	minimalny minimal	pomarańczowa orange
L-S-7	2,4-D = 1,0	0,25	0,0	eksplantaty lekko żółkną explants turn slightly yellow	dobry good	brunatno-zielona brownish-green
L-S-8	2,4-D = 2,0	0,25	0,0	eksplantaty zielone explants green	dobry good	brunatno-zielona + biała brown-green + white
L-S-9	IAA = 2,0	0,45	100,0	bardzo długie, sięgające głęboko w pożywkę very long reaching deep into medium	dobry good	brunatna + zielona brown + green
L-S-10	IAA = 2,0	2,45	100,0	bardzo długie, liczne silnie splątane korzenie boczne very long, numerous tangled lateral roots	słaby weak	brunatna + zielona brown + green
L-S-11	IAA = 5,0	1,25	75,0	dłuższe niż L-S-10, zbijają się na dnie probówki, mniej korzeni bocznych longer than on L-S-10, matted together at flask bottom, less lateral roots	dobry good	brunatna + zielona brown + green
L-S-12	IAA = 5,0	2,75	100,0	bardzo długie i stosunkowo grube very long and relatively thick	dobry good	brunatna + zielona brown + green

natomiast ulegały wyraźnemu skracaniu i obrastały kalusem (rys. 4). Charakterystyczną cechą stanowił zanik reakcji geotropicznej i rozwój tych organów nad pożywką przy wszystkich stężeniach NAA (rys. 5).

Na pożywkach wzbogaconych 2,4-D, tylko przy najniższym stężeniu pojawiły się korzenie w stosunkowo wysokim procencie, natomiast przy stężeniu $2,0 \text{ mg/dm}^3$ na zielonych fragmentach hypokotyli rozwijał się kalus.

Bez względu na rodzaj użytej auksyny, zarówno zdolność do wydłużania korzeni (NAA), jak i stymulacja liczby zawiązków (2,4-D) na eksplantatach była odwrotnie proporcjonalna do inicjacji i namnażania kalusa.

Rezultaty naszych badań są zgodne z wynikami uzyskanymi przez J e l a s k ą (1974), która do ukorzeniania się wycinków z hypokotyli *Cucurbita pepo* L. użyła pożywki Murashige i Skooga, pozbawionej regulatorów wzrostu i uzyskała zamierzony efekt, nie stwierdzając takiej reakcji na podłożu przygotowanym według Hellera. Wykryte przez nas fakty można przypisać działaniu podłoża. Inne czynniki ryzogeniczne, wymieniane przez J e l a s k ą (1974), R o g o z i ń s k ą (1971) i innych, takie jak warunki świetlne i temperatura oraz rodzaj i stężenie cukru w porównywanych kulturach, były podobne.

Przy wyższych stężeniach NAA i 2,4-D ($1,0$ i $2,0 \text{ mg/dm}^3$ pożywki) przyrost kalusa był duży lub bardzo duży (rys. 6). Wytworzona tkanka kalusowa była zabarwiona zielono, żółto, brunatnie i pomarańczowo; co wskazuje na możliwość syntezy również i innych barwników obok chlorofilów.

Wprowadzenie do podłoża L-S, IAA i kinetyny, w stężeniu wyższym niż przy 2,4-D i NAA, wpłynęło nie tylko na pojawienie się licznych korzeni o rozmiarach nie obserwowanych w opisanych wcześniej warunkach, ale przede wszystkim zapewniło im właściwą reakcję geotropiczną. Przy stężeniu 2 mg/dm^3 IAA i $2,45 \text{ mg/dm}^3$ kinetyny również pojawiły się liczne korzenie boczne (rys. 7). Inicjacja ryzogenezy należy do znanych efektów auksynowych. Między innymi T u r e t s k a y a i K e f e l i (1968) badając ukorzenianie wycinków łodyg stwierdzili, że stymulacja tego procesu wynika ze zmiany stosunku endogennych auksyn i inhibitorów wzrostu po wprowadzeniu egzogennej IAA. Uznali oni, że działanie auksyny ogranicza się do okresu poprzedzającego inicjację podziałów komórkowych w łodydze, po czym wrażliwość na egzogennej IAA zanika. Z badań L o o m i s a i T o r r e y a z 1964, T o r r e y a i L o o m i s a z 1967 oraz W e b s t e r a i R a d i n a z 1972 wynika, że NAA podany od strony podstawy korzenia wywołuje pobudzenie wypowe w perycyklu i wielokrotniony rozwój korzeni bocznych. W prowadzonych przez nas badaniach przy podwyższeniu dawki kinetyny (pożywka L-S-12 z tabeli 1) obserwowaliśmy wyraźne zwiększone średnice korzeni. Dane te korespondują z wynikami wspomnianych wyżej autorów, przypisujących takie efekty wspólnemu działaniu cytokinin i auksyn.

Na wzrost korzeni składają się zarówno podziały komórkowe, jak i elongacja komórek, przy czym auksynom przypisuje się rolę stymulatorów kariokinezy, a

cytokininom – cytokinezy. Z drugiej strony znany jest mechanizm wpływu IAA na elastyczną i plastyczną rozciągliwość ścian celulozowych w czasie wzrostu komórek.

Na pożywkach zawierających IAA i kinetynę ryzogenezie towarzyszyło namnażanie kalusa o zielono-brunatnym zabarwieniu. Postępujące ciemnienie tkanki zadecydowało o odrzuceniu tego typu podłoża.

Drugim specyficznym efektem histogenetycznym, nie występującym na wcześniej omówionych pożywkach, było pojawianie się wewnętrznego kalusa i znaczne powiększenie eksplantatów pierwotnych. Proces ten zachodził zarówno przy wysokim stężeniu kinetyny wobec 5 mg/dm^3 IAA, jak i przy niskim stężeniu kinetyny wobec 2 mg/dm^3 IAA (L-S-9, L-S-11, L-S-12, z wyjątkiem L-S-10). Zjawiska tego typu obserwowane na wycinkach dyni zostały szczegółowo omówione przez J e l a s k ą (1966), B a n e r j i i L a l o r a y a (1966) i N o w a k (1978).

Po repasażu kalusa i jego pięcioletniej hodowli (pasaż I) stwierdzono, że największy przyrost świeżej masy miał miejsce w obecności NAA (pożywka L-S-4 w stężeniu $2,0 \text{ mg/dm}^3$), a w przypadku stosowania 2,4-D – przy stężeniu 1 mg/dm^3 (L-S-7) (tab. 2).

Tylko w jednym przypadku (pożywka L-S-5) doszło do rozwoju form teratologicznych. Z tworzącej się tkanki układały się stożkowate struktury zbudowane z liściopodobnych, bezbarwnych, gęsto ułożonych elementów (rys. 8).

Zastosowanie kinetyny w stężeniu wyższym od $0,45 \text{ mg/dm}^3$, w obecności 2 i 5 mg/dm^3 IAA (tab. 3) okazało się nieekonomiczne. Przy wysokim zużyciu pożywki stwierdzono znacznie niższy przyrost masy niż na pożywkach wzbogaconych NAA lub 2,4-D. Z tym zastrzeżeniem najlepsze efekty uzyskano przy stosowaniu auksyny w stężeniu równym $5,0 \text{ mg/dm}^3$ (pożywka L-S-12). Wysokie dawki kinetyny i auksyny zagwarantowały najniższe zużycie pożywki na gram wyprodukowanej tkanki. Tym niemniej w tych warunkach ujawniły się zaburzenia we właściwej reakcji geotropicznej korzeni. Cecha ta miała charakter trwały. W pięcioletniej kulturze kalusa nie stwierdzono zmiany wrażliwości korzeni na bodziec grawitacyjny. Na podobny, ale krótkotrwały efekt zwrócili uwagę C h i n i S c o t t (1977) w przypadku 12- i 14-dniowych kultur kalusa jęczmienia i pszenicy.

W tabeli 2 ujęto również wyniki hodowli kalusa po 2 pasażach. Na uwagę zasługują następujące fakty. Po wprowadzeniu do pożywki L-S, NAA, najwyższy przyrost świeżej masy tkanki, przy najmniejszym zużyciu pożywki, uzyskano przy stosowaniu $1,0 \text{ mg/dm}^3$ auksyny. Natomiast na podstawie wizualnej oceny kalusa, jego zabarwienia i potencjalnej aktywności merystematycznej, lepsze wydaje się stężenie NAA równe 2 mg/dm^3 pożywki. W odniesieniu do drugiej stosowanej auksyny wszystkie pozytywne cechy ujawniły się przy stężeniu 2,4-D równym $1,0 \text{ mg/dm}^3$ pożywki.

Tabela 2

Wpływ NAA i 2,4-D na wzrost, uwodnienie, zużycie pożywki i ryzogenezę kalusa *Cucumis sati*
 Influence of NAA and 2,4-D on growth, hydration, medium utilisation and rhizogene-
 with constant kinetin

Oznaczenie pożywki Medium	Stężenie i ro- dzaj auksyny Auxin concentra- tion and kind mg/dm ³	Przyrost świeżej masy tkanki Fresh mass increment g	Uwodnienie tkanki Tissue hydration %	Zużycie pożywki na 1 g tkanki Medium utilisation per 1 g tissue g
		Ip 1,47	94,2	3,57
L-S-1	NAA = 0,1	IIp 1,11	93,9	3,30
		Ip 3,90	95,5	3,95
L-S-2	NAA = 0,5	IIp 0,80	93,7	3,94
		Ip 4,48	95,6	2,24
L-S-3	NAA = 1,0	IIp 1,14	93,7	2,82
		Ip 4,88	95,0	3,58
L-S-4	NAA = 2,0	IIp 0,81	93,0	3,55
		Ip 1,17	94,0	6,92
L-S-5	2,4-D = 0,1	IIp 1,44	93,0	2,92
		Ip 1,14	93,3	6,26
L-S-6	2,4-D = 0,5	IIp 0,20	91,9	10,37
		Ip 1,66	94,7	2,28
L-S-7	2,4-D = 1,0	IIp 0,54	92,6	4,71
		Ip 1,17	94,3	3,95
L-S-8	2,4-D = 2,0	IIp 0,39	91,7	3,48

— Table 2

ous L. w I i II pasażu, na pożywce Linsmaier i Skooga przy stałym poziomie kinetyny 0,25 mg/dm³
 sis of *Cucumis sativus* L. callus in passages I and II, on Linsmaier and Skoog medium
 level 0,25 mg/dm³

Barwa kalusa Callus colour	Ryzogeneza kalusa Callus rhizogenesis		Przyrost świeżej masy tkanki po 10 tyg. hodowli	Zużycie pożywki na 1 g tkanki po 10 tyg. hodowli
	ukorzenie- nie rooting %	cechy korzeni description of roots	Tissue fresh mass increment after 10 weeks culture	Medium uti- lisation per 1 g of tissue after 10 weeks culture
żółto-zielona + ciemna zieleń yellow-green + dark green	100,0	bardzo krótkie very short	2,58	6,87
żółto-zielona yellow-green	25,0	drobne minute		
zielona + pomarańczowa green + orange	42,0	krótkie short	4,70	7,89
ciemna zieleń dark green	100,0	krótkie short		
zielona + ciemna zieleń green + dark green	75,0	krótkie short	5,62	5,06
brunatna + zielona brown + green	100,0	krótkie short		
zielona + pomarańczowa green + orange	80,0	bardzo krótkie very short	5,69	7,13
ciemna zieleń + biała dark green + white	57,1	pokryte kalusem covered with callus		
zielona + biała green + white	81,8	organogeneza terato- logiczna	2,61	9,84
		teratologic organo- genesis		
ciemna zieleń + biała dark green + white	33,3	krótkie short	1,34	16,63
żółto-zielona yellow-green	50,0	bardzo krótkie very short		
żółta yellow	66,7	krótkie short	2,20	6,99
zielona + żółto-zielona green + yellow-green	0,0	—		
brunatna brown	0,0	—	1,56	7,43
zielona + żółta + brunatno-żółta green + yellow + brown-green	18,2	stadium inicjacji dro- bnych korzeni initiation stage of minute roots		
żółta yellow	28,7	krótkie short		

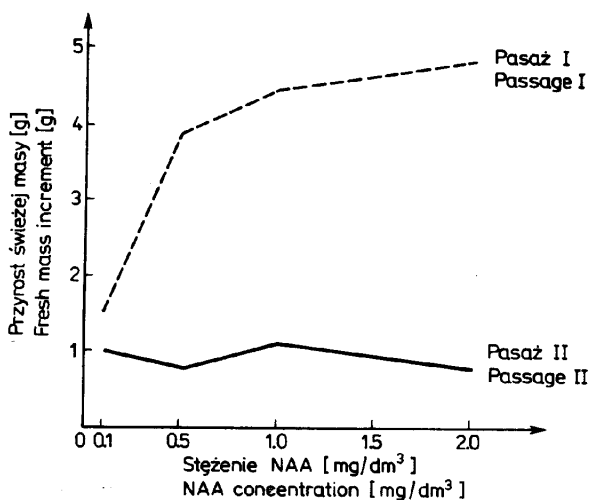
Tabela 3 – Table 3

Wpływ różnych stężeń kinetyny i IAA na wzrost, uwodnienie i ryzogenezę kultury kalusa *Cucumis sativus* L., oraz na zużycie pożywki
Linsmaier i Skooga. Pasaż I

Influence of various kinetin concentration and IAA on growth, hydration and rhizogenesis in callus culture of *Cucumis sativus* L.
and on utilisation of Linsmaier and Skoog medium. Passage I

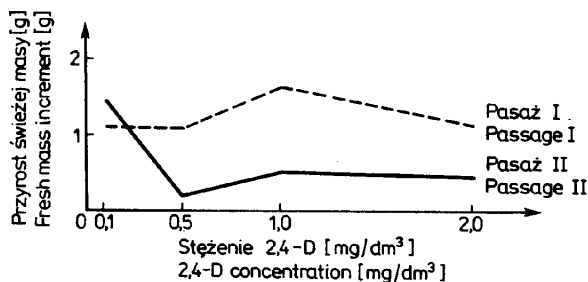
Oznaczenie pożywki Medium	Stężenie kinetyny Kinetin con- centration mg/dm ³	Stężenie IAA concentration mg/dm ³	Przyrost świeżej masy tkanki Tissue fresh mass increment g	Uwodnienie tkanki Tissue hydrogenation %	Zużycie po- żywki na 1 g tkanki Medium utilisa- tion per 1 g tissue g	Barwa kalusa Callus colour	Ryzogeneza kalusa Callus rhizogenesis	
							ukorzenienie rooting %	cechy korzeni root description
L-S-9	0,45	2,0	0,09	91,4	21,8	brunatna + zielona brown + green	25,0	stadium zawiązków primordium stage
L-S-10	2,45	2,0	0,27	92,6	12,7	jasno-zielona light green	16,7	"
L-S-11	1,25	5,0	0,39	90,4	9,0	jasno-zielona light green	40,0	"
L-S-12	2,75	5,0	0,54	92,0	6,6	ciemna zieleń dark green	40,0	bardzo drobne o nie- typowym kierunku wzrostu minute with nontypi- cal growth direction

Porównanie przyrostu świeżej masy tkanki z pasażu I i II pozwoliło na stwierdzenie ogólnego spadku produkcji masy w miarę upływu czasu, przy czym ograniczenie przyrostu było bardziej wyraźne na pożywkach wzbogaconych NAA. Tylko przy najniższych stężeniach NAA i 2,4-D różnice były nieznaczne (rys. 9, 10).



Rys. 9. Przyrost świeżej masy kalusa *Cucumis sativus* L. na pożywce Linsmaier i Skooga z NAA (pasaż I i II)

Fig. 9. Fresh mass increment in *Cucumis sativus* callus L. on Linsmaier and Skoog medium with NAA (passages I and II)



Rys. 10. Przyrost świeżej masy kalusa *Cucumis sativus* L. hodowanego na pożywce Linsmaier i Skooga uzupełnionej 2,4-D (pasaż I i II)

Fig. 10. Callus fresh mass increment of *Cucumis sativus* L. cultured on medium of Linsmaier and Skooga supplemented with 2,4-D (passages I and II)

Po I i II pasażu kalusa zaobserwowano tendencję do stopniowego skracania korzeni i zmniejszania ich średnicy, przy zachowanych zdolnościach ryzogenicznych. Natomiast wcześniej T o r r e y (1959), potem R o g o z i ń s k a (1971) zwrócili uwagę właśnie na spadek aktywności ryzogenicznej tkanek marchwi i grochu w kolejnych repasażach. Cytowani autorzy sugerowali, że przyczyną tego faktu może być wyczerpanie specyficznego czynnika zawartego w eksplantacie pierwotnym, a nie syntetyzowanego *in vitro*.

Po pierwszym pasażu kalus zabarwiony był z reguły zielono, żółtozielono, tylko przypowierzchniowo pomarańczowo i brązowo, natomiast w 2 pasażu, podobnie jak to miało miejsce w kulturach pierwotnych, stwierdzono odbarwianie się tkanki.

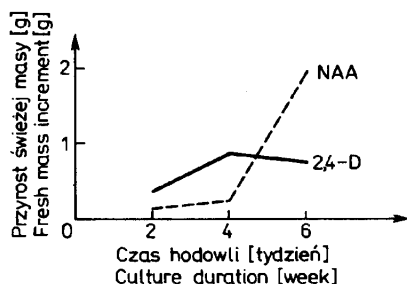
Analizując przyrosty świeżej masy tkanki w stosunku do zużycia pożywki na 1 g tkanki, po 10 tygodniach hodowli (I i II pasaż) ustalono, że pożywki wzbogacane NAA są bardziej wydajne niż uzupełnione przez 2,4-D.

Dla wyprodukowania 1 g świeżej masy tkanki najwyższe zużycie pożywki zachodzi po wprowadzeniu NAA lub 2,4-D w ilości $0,5 \text{ mg/dm}^3$, natomiast ekonomiczne są pożywki uzupełniane $1,0 \text{ mg/dm}^3$ zarówno NAA jak i 2,4-D. Do serii doświadczeń wykorzystano takie stężenia NAA i 2,4-D, które miały na celu ustalenie optymalnego czasu dla repasażu. Ilustrację tego zagadnienia przedstawiono na rysunku 11. W czasie 6-tygodniowego wzrostu, w przypadku 2,4-D, największy przyrost świeżej masy miał miejsce około 4 tygodnia hodowli. Po dalszych dwóch tygodniach tzn. między 4 a 6 tygodniem hodowli wystąpiły nieznaczne tendencje spadkowe. Dane te nie korespondują z wynikami dla kalusa ziemniaka (S h a w i n., 1976) o maksymalnym wzroście między 2 a 3 tygodniem hodowli, są natomiast zbliżone do wyników uzyskanych dla bobu przez M i c h e l l i G i l d o w (1975), którzy stwierdzili maksimum wzrostu między 20 a 30 dniem hodowli. W przypadku tkanek hodowanych na pożywkach wzbogaconych NAA przyrost świeżej masy kalusa w ciągu pierwszych 4 tygodni był niewielki, natomiast obserwowano bardzo wysoki przyrost między 4 a 6 tygodniem.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. W odniesieniu do wpływu pożywek na produkcję kalusa i ryzogenezy stwierdzono:

- a) nieprzydatność pożywki White'a do inicjacji obydwu procesów,
- b) w przypadku pożywki Linsmaier i Skooga uzależnienie badanych procesów od rodzaju użytych auksyn. Inhibitorem ryzogenezy na eksplantatach pierwotnych okazał się 2,4-D w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$, natomiast w kulturach kalusa w stężeniu $1,0 \text{ mg/dm}^3$ przy zawartości kinetyny równej $0,25 \text{ mg/dm}^3$. Obecne w podłożu NAA lub IAA stymulowały produkcję kalusa i ryzogenezę zarówno na eksplantatach, jak i na kalusie. Prawidłowe położenie korzeni względem bodźca geotropicznego obserwowano na pożywkach z IAA.



Rys. 11. Przyrost świeżej masy kalusa *Cucumis sativus* L. na pożywce Linsmaier i Skooga wzbogaconej 1 mg/dm³ NAA lub 2,4-D 1 mg/dm³ między 2 a 6 tygodniem hodowli (I pasaż)

Fig. 11. Callus fresh mass increment of *Cucumis sativus* L. on Linsmaier and Skoog medium enriched with 1 mg/dm³ NAA or 2,4-D 1 mg/dm³ between 2nd and 6th week of culture (passage I)

2. Badając wpływ różnych stężeń IAA, NAA i 2,4-D i kinetyny na przyrost świeżej masy ustalono, że optymalne było stężenie NAA = 1,0 mg/dm³ i kinetyny = 0,25 mg/dm³.

3. Ustalając najwłaściwszy czas dla repasażu tkanki, stwierdzono najwyższy przyrost świeżej masy tkanki około 4 tygodnia hodowli po wprowadzeniu do pożywki 2,4-D oraz sukcesywnie zwiększający się przyrost świeżej masy tkanki od 4 do 6 tygodnia hodowli po uzupełnieniu pożywki NAA.

Kierownictwu Zakładu Hodowli i Genetyki Instytutu Warzywnictwa w Regulach składamy podziękowanie za ofiarowanie materiału.

STRESZCZENIE

Analizowano procesy inicjacji kalusa i ryzogenezy na eksplantatach z hypokotyli *Cucumis sativus* L. linii żeńskiej (l. ż.) M₆ i na kalusie w ciągu 10 tygodni hodowli.

Stwierdzono nieprzydatność pożywki White'a zmodyfikowanej według Streeta i McGregora (1952) do ukorzenienia wycinków i namnożenia tkanki kalusowej.

Na podłożu podstawowym Linsmaiera i Skooga (1962) inhibitorem ryzogenezy okazał się w przypadku eksplantatów pierwotnych 2,4-D, użyty w stężeniach wyższych od 0,1 mg/dm³ pożywki.

Wprowadzenie do podłoża IAA w stężeniu 2 lub 5 mg/dm³ stymulowało w 100% ukorzenienia eksplantatów, natomiast obecność NAA powodowała zmianę wrażliwości korzeni na bodziec grawitacyjny.

W odniesieniu do kultur kalusa 1 i 2 pasażu stwierdzono, że gdy stężenie kinetyny w podłożu utrzymywano na poziomie 0,25 mg/dm³ a poziom 2,4-D zwiększano od 0,1 mg/dm³ do 2 mg/dm³, to 100% inhibicja ukorzenienia wystąpiła przy 1,0 mg/dm³ tej auksyny. Natomiast w przypadku NAA nie wykryto prostych zależności między stężeniem auksyny a % ukorzenienia kalusa z 1 i 2 pasażu.

Przy różnym stężeniu kinetyny i 2 lub 5 mg/dm³ IAA wykryto różnice w % ukorzenienia kalusa z 1 pasażu i zmiany naturalnej pozycji drobnych korzeni wobec grawitacji.

Uwzględniając zużycie pożywki na 1 g wyprodukowanej tkanki przyjęto, że optymalne stężenie NAA wynosi 1,0 mg/dm³.

Ustalając odpowiedni czas repasażu stwierdzono, że na pożywkach zawierających 2,4-D w stężeniu 1,0 mg/dm³ i kinetyny (0,250 mg/dm³) największy przyrost świeżej masy tkanki ma miejsce około 4 tygodnia hodowli, a po wprowadzeniu NAA między 4 a 6 tygodniem hodowli.

LITERATURA

- Benerji D., Laloraya M. M., 1966. Comparative effects of indole-3 acetic acid, kinetin and gibberelic acid on growth of isolated *Cucurbita pepo* cotyledons. Curr. Sci. 35: 601.
- Chin J. C., Scott K. J., 1977. The isolation of high-rooting cereal callus line by recurrent selections with 2,4-D. Z. Pflanzenphysiol. 85: 117-124.
- Fadia V. P., Mehta A. R., 1972. Tissue culture studies on cucurbits: II. Effect of kinetin alone and in combination with auxin and gibberellic acid on growth of *Cucumis* callus culture. J. Maharaja Sayajirao University of Boroda 3: 35-39.
- Fadia V. P., Mehta A. R., 1975. Tissue culture studies on cucurbits: Factors limiting growth of *Cucumis melo* L. Tissue grown as batch cultures. Indian J. Experimental Biology 13: 550-591.
- Jelaska S., 1966. The effect of 2-naphthoxyacetic and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the cotyledon tissue of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) growing in vitro. Acta Bot. Croat. 15: 121-135.
- Jelaska S., 1974. Rhizogenesis of pumpkin hypocotyl explants. Acta Bot. Croat. 33: 73-80.
- Linsmaier E. M., Skoog F., 1964. Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 110-127.
- Loomis R. S., Torrey J. G., 1964. Chemical control of vascular cambium initiation in isolated radish roots. Proc. Nat. Acad. Sci. 52: 3-11.
- Malepszy S., 1977. Uzyskiwanie roślin w kulturach kalusowych haploidów *Nicotiana glauca* Speget comes in vitro. Acta Biol. Univ. Śl. 3: 9-16.
- Maciejewska-Potapczyk W., Rennert A., Milewska E., 1972. Callus induction and growth of tissue cultures derived from cucumber plant organs of four different sex types. Acta Soc. Bot. Pol. 41: 329-339.
- Mitchell J. P., Gildow F. E., 1975. The initiations and maintenance of *Vicia faba* tissue cultures. Physiol. Plant. 34: 250-252.
- Murashige T., 1973. Sample preparations of media c. Plant Cultures. [In:] Tissue culture methods and applications, Ed. P. K. Kruse JR. and M. K. Patterson Jr. Academic Press. New York-San Francisco-London.
- Nowak K., 1978. *Cucurbita maxima* Duch. Bambino w kulturze in vitro. Acta Biol. Univ. Śl. 5: 114-122.
- Potapczyk W., 1971. Od nasienia do nasienia. PWN, Warszawa.
- Rogosińska J., 1971. Hodowla tkanek roślinnych i jej przydatność. Kosmos A. 1: 39-48.
- Shaw R., Varns J. L., Miller K. A., Talley E. A., 1976. Potato tuber callus. Plant Physiol. 38: 464-467.
- Skoog F., Miller W., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118.
- Street H. E., McGregor S. M., 1952. Technique of organ, tissue and free cell cultures. Methods Biology and Physiology. Ed. E. N. Willmer, Acad. Press. New York 3: 473.
- Torrey J. G. 1959. Experimental modification of development in the root. [In:] Cell organism and milieu, Ed. Rudnick, Ronald Press. New York, s. 189-222.
- Torrey J. G., Loomis R. S., 1967. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of *Raphanus*. Amer. J. Bot. 54: 1098-1106.

- Turetskaya R. Kh., Kefeli V. I., 1968. Regulatory wzrostu roślin a proces tworzenia korzeni. III Sympozjum o regulatorach wzrostu roślin UMK, Toruń, 11 - 14 wrzesień, s. 16 - 17.
- Webster B. D., Radin J. W., 1972. Growth and development of cultured radish roots. Amer. J. Bot. 59: 744 - 751.
- White Ph. R., 1943. A handbook of plant tissue culture. Tempe, Ariz. The Jaques Cattell Press. Inc. 4: 791 - 794.
- Wojciechowska B., Nowak K., Kurzik - Dumke U., 1980. *Bryonia dioica* w kulturze in vitro. Acta Biol. Univ. Śl. 9: 49 - 59.