Wpływ substancji wzrostowych na organogenezę pędów igliczni

The influence of growth substances on the organogenesis of Honey locust shoots

J. H. ROGOZIŃSKA

Na podstawie doświadczeń i obserwacji Went (1938) sugerował, iż zarówno pęd, jak i każdy inny organ rośliny ma swe własne, specyficzne wymagania odnośnie czynników wzrostu. Wzrost pędów może być stymulowany lub hamowany poprzez wpływ korzeni lub zawiązków korzeni na ogólny metabolizm substancji wzrostowych (Howell 1954). Wiadomo, że substancje wzrostowe modyfikują aktywność tkanek i intensywność proliferacji, która zależna jest zarówno od ich poziomu w pożywce, jak i stanu fizjologicznego pobranego eksplantatu (Skoog i Miller 1957; Gautheret 1959; Jacquot 1964). Z substancji wzrostowych wpływających na procesy regeneracyjne eksplantatów roślinnych, w niniejszej pracy uwzględniono auksyny, cytokiny oraz giberelinę.

Ze względu na występowanie u igliczni triakantyny (izomeru bardzo aktywnej cytokiny), doświadczenia przeprowadzono na tym właśnie gatunku, którego pędy nie były dotychczas badane w hodowli *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły jednoroczne pędy igliczni (*Gleditsia triacanthos* L.) pobrane w okresie ich spoczynku (październik 1965 rok) z około 80-letnich drzew, rosnących w Arboretum Kórnickim PAN. Pędy sterylizowano zewnętrznie przez opalanie, po krótkim potraktowaniu etanolem, po czym odcinki długości około 2 cm wyszczepiano na pożywkę White'a (Murashige i Skoog 1962, str. 475). Do pożywki dodawano następujące auksyny w stężeniu 1 mg/l: kwas indoliloctowy (IAA), kwas naftalenoctowy (NAA), kwas 2,4-dwuchlorofenoksyctowy (2,4-D). Wpływ każdej z auksyn badano osobno i w kombinacji z kinetyną (K) lub benzyloaminopuryną (BAP), o stężeniu 10 µg/l. Pożywkę kontrolną stanowiła pełna pożywka bez auksyn czy cytokin.

Celem stwierdzenia wpływu tych substancji na zjawisko biegunowości, połowę eksplantatów umieszczano w pożywce biegunem dolnym, a drugą połowę biegunem górnym. W każdej serii było dwanaście powtórzeń.

Hodowle umieszczano w temperaturze 25°C, w słabym świetle rozproszonym. W okresie ośmiotygodniowej hodowli pędów (12.10–4.12.1965), prowadzono obserwacje, a przy zakończeniu doświadczeń wykonano zdjęcia reprezentatywnych eksplantatów oraz obserwacje mikroskopowe.

WYNIKI

W doświadczeniach wstępnych nad ukorzenianiem pędów igliczni (przeprowadzonych w analogicznych warunkach jak w pracy Domańskiego, 1967 z ukorzenianiem pędów wierzb), otrzymano wyniki negatywne. Sugerowało to, że pędy tego gatunku wymagają pełnej pożywki i że nie są zdolne do syntezy substancji

Fot. mgr K. Jakusz

Ryc. 1. Pędy igliczni hodowane na pożywce White'a przy nieobecności substancji wzrostowych
Honey locust shoots grown on White's medium in absence of growth substances

wzrostowych w wystarczających ilościach i wymagają pewnego ich poziomu w pożywce dla zainicjowania procesów podziału, wzrostu i organogenezy. Z tego względu interesującym wydawało się przebadanie wpływu auksyn i cytokinin na procesy regeneracyjne eksplantatów igliczni w sterylnej hodowli *in vitro*.

Uzyskane rezultaty ilustrowane są zdjęciami makro- i mikroskopowymi. Na zdjęciach makroskopowych po lewej stronie przedstawiono odcinki pędu umieszczone biegunem górnym w pożywce, a po prawej stronie biegunem dolnym.

W wyniku wyszczepienia pędów igliczni na pełną pożywkę, wytworzył się na nich słabo rozwinięty kalus, który jednak nie uległ żadnemu różnicowaniu (ryc. 1).

Dopiero uzupełnienie pożywki IAA wywołało zwiększenie tworzenia kalusa i jego różnicowanie (ryc. 2). Jak widać na rycinie, pędy igliczni umieszczone biegunem górnym w pożywce z IAA, tworzyły na części bazypetalnej obfity kalus. Na pędach umieszczonych biegunem dolnym w pożywce, tworzył się kalus i korzenie (ryc. 2). IAA wraz z cytokininami determinowały typ i intensywność wzrostu izolowanych pędów igliczni. Pędy hodowane na pożywkach z IAA lub w kombinacji z cytokininami, były znacznie grubsze i posiadały bujniejszy kalus. Kalus tworzył się

IAA 1 mg/l

IAA 1 mg/l + K 10 μ g/l

IAA 1 mg/l + BAP 10 μ g/l

Fot. mgr K. Jakusz

Ryc. 2. Wpływ kwasu indoliloctowego, kinetyny i benzyloaminopuryny na wzrost i organogenezę izolowanych pędów igliczni
The influence of indoleacetic acid, kinetin and benzylaminopurine on the growth and organogenesis of isolated Honey locust shoots

silnie również w miejscach występowania przetchlinek (ryc. 2). Jak wykazały obserwacje preparatów mikroskopowych, wytwarzał się on w znacznych ilościach na terytorium kory pierwotnej, ale najbujniejszy jego rozwój miał właśnie miejsce w przetchlinkach (ryc. 3). Obecność K lub BAP w kombinacji z IAA, wywoływała nie tylko bujniejszy wzrost kalusa, ale i pewne jego różnicowanie przybierające często formę pędów (ryc. 4).

Analogiczne kombinacje pożywek z zastosowaniem NAA lub 2,4-D zamiast IAA, dały podobne rezultaty. Na eksplantatach umieszczonych w pożywce z NAA lub 2,4-D korzenie rozwijały się równie dobrze, jak na pożywce z IAA. Rozwój

Fot. dr A. Hejnowicz

Ryc. 3. Część przekroju poprzecznego pędu igliczni z przetchlinką (pow. 90 $\times$). Pęd hodowany na pożywce z 2,4-D 1 mg/l.

Portion of a cross section of Honey locust shoot showing a lenticel (enlargement 90 $\times$). Shoot cultivated on medium with 2,4-D 1mg/l

kalusa natomiast jak i jego różnicowanie prowadzące do powstania struktur pędopodobnych było aktywniejsze, zwłaszcza w obecności 2,4-D, a szczególnie w kombinacji z BAP.

Badane substancje wzrostowe w stosowanych stężeniach i proporcjach, nie wywarły wpływu na zjawisko begunowości. Tworzenie korzeni obserwowano jedynie na eksplantatach, które umieszczone były w pożywce begunem dolnym.

Celem uzyskania dalszego rozwoju pędów, pewną ilość eksplantatów przeszczepiono po dwóch miesiącach hodowli na pożywkę z NAA (2 mg/l) lub BAP (50 μ g/l), a część na pożywkę z obu wymienionymi substancjami. Jedną z kombinacji pożywek zawierała poza NAA i BAP kwas giberelowy o stężeniu 10 mg/l, ponieważ wiadomo że w różnicowaniu mogą uczestniczyć również gibereliny. Jednakże w okresie dwumiesięcznej hodowli nie stwierdzono dalszego rozwoju eksplantatów. Wskazuje to na konieczność kontynuacji podjętych badań wstępných w kierunku poznania wymagań pędów co do składu pożywki, w zależności od ich stanu fizjologicznego.

DYSKUSJA

Obszerne prace dotyczące hodowli tkanek wielu roślin drzewiastych *in vitro* prowadził Jacquot (1964). Badania te dotyczyły wpływu na organogenezę różnych

2,4 D 1 mg/l + BAP 10 μ g/l

NAA 1 mg/l + BAP 10 μ g/l

IAA 1 mg/l + BAP 10 μ g/l

Fot. mgr K. Jakusz

Ryc. 4. Różnicowanie pędów igliczni wywołane auksynami i benzyloaminopuryną
Differentiation of Honey locust shoots under the influence of auxins and benzylaminopurine

substancji odżywczych, jak i regulatorów wzrostu. Nie obejmowały one jednakże igliczni, która ze względu na swój alkaloid — triakantynę, wydawała się interesującym obiektem badań morfogenetycznych (Rogozińska 1967).

W zależności od różnych zdolności do morfogenezy, Gautheret (1959) klasyfikuje rośliny na trzy grupy. 1) charakteryzujące się spontanicznym tworzeniem organów bez dodania substancji wzrostowych, 2) wykazujące właściwości organogenezy w wyniku działania substancji wzrostowych, 3) nie wykazujące różnicowania pod wpływem substancji wzrostowych. Zgodnie z powyższym, i na podstawie przeprowadzonych badań, zaklasyfikować można iglicznę do drugiej grupy. Stwierdzono bowiem, że iglicznia jest zdolna do tworzenia korzeni przy obecności auksyn w pożywce. Oznacza to, zdaniem Gautheret (1959), że w procesie organogenezy substancje wzrostowe odkrywają pewne istniejące właściwości morfogenetyczne tkanek, potęgując lub blokując je swą obecnością.

Badano również wpływ substancji wzrostowych na zjawisko biegunowości. W stosunku do eksplantatów, stosowane substancje wzrostowe nie wykazały aktywności. Nie uzyskano bowiem żadnych zmian polarności, jakkolwiek możliwość taka istnieje u niektórych roślin (Gautheret 1959). Pokrywałoby się to z przekonaniami cytowanego autora, który uważa że substancje wzrostowe działają w morfogenezie katalitycznie nie tworząc jednak nowych możliwości twórczych.

Efekty cytokinin trudno uogólnić, gdyż BAP jak i K stosowano tylko w jednym stężeniu (10 $\mu\text{g/l}$), ale mimo to ich współdziałanie z auksynami we wpływie na wzrost i rozwój pędów jest widoczne. Można się spodziewać, że u igliczni, podobnie jak u innych roślin, odpowiedni stosunek auksyn do cytokinin, będzie określał tempo i typ wzrostu. W badaniach nie uzyskano dalszego rozwoju pędów po ich pasażowaniu na pożywkę z NAA i BAP, nawet po uzupełnieniu jej kwasem giberelowym. Być może, jakieś inne jeszcze nieznane czynniki potrzebne są do dalszego rozwoju pędów igliczni, lub też stężenie auksyn i cytokinin w pożywce oraz ich wzajemny stosunek ilościowy był nieodpowiedni dla dalszego rozwoju eksplantatów (Skoog i Miller 1957).

Badania nad wpływem auksyn, triakantyny i cytokinin na wzrost liścieni igliczni, przeprowadzone przez autorkę (1967), wykazały również niezbędność auksyn dla procesu ryzogenezy a cytokinin dla procesu tworzenia się pączków. Podjęte prace wstępne w nawiązaniu do wyżej wspomnianej sugerują niezbędność kontynuacji badań, celem uzyskania pełniejszego obrazu wpływu regulatorów wzrostu na morfogenezę u igliczni.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono wstępne badania *in vitro* nad zależnością wzrostu i organogenezy odcinków pędów igliczni od auksyn (1 mg/l.), cytokinin (10 $\mu\text{g/l}$) i kwasu giberelowego (10 mg/l). Substancje te wpływają na typ wzrostu jak i proces różnicowania.

Aktywności oddziaływania auksyn na procesy wzrostowe pędów igliczni kształtowały się podobnie jak w odniesieniu do większości roślin, tzn. słabiej działał IAA, silniej NAA, a najmocniej 2,4-D. Stymulujący wpływ auksyn na procesy wzrostowe i morfogenetyczne zwiększony był obec-

nością cytokinin (K, BAP) w pożywce. Wykazano więc, że zarówno auksyny, jak i cytokiny niezbędne są dla optymalnego różnicowania.

Stwierdzono, że zdolność igliczni do ryzogenezy, ujawnia się dopiero pod wpływem dodanych auksyn. Stosowane substancje wzrostowe nie modyfikowały zjawiska begunowości pędów i korzenie tworzyły się tylko na eksplantatach umieszczonych begunem dolnym w pożywce.

Pragnę podziękować dr A. Hejnowicz za zrobienie preparatów mikroskopowych i mikro-fotografii.

Zakład Dendrologii
i Arboretum Kórnickie PAN
w Kórniku.

(Wpłynęło dn. 15.1.1968).

SUMMARY

Preliminary experiments were carried out in vitro, on the dependence of growth and organogenesis of Honey locust shoots in the presence of auxins (1 mg/l), cytokinins (10 μ g/l) and gibberellic acid (10 mg/l). It was found, that these substances influenced the type of growth and the differentiation processes.

The influence of auxins on the growth of Honey locust shoots increased from IAA through NAA to 2,4-D. The stimulatory effect of auxins was increased by the presence of cytokinins (K, BAP) in the medium. It should be pointed out that both auxins and cytokinins are necessary for optimal differentiation.

It was demonstrated that the capacity for rizogenesis of Honey locust shoots is revealed only under the influence of added auxins. The growth substances used did not modify shoot polarity and the roots were formed only on explants placed with the basipetal end in the medium.

LITERATURA

- Domański R. Z., 1967, Ukorzenianie się sadzonek wierzb, PTPN, Prace Kom. N. Roln. i Kom. N. Leśnych 23: 37—50.
- Gautheret R. J., 1959, La Culture des Tissus Végétaux, Masson & Cie, Éditeurs. s. 863.
- Howell R. W., 1955, The Inhibiting Effect of Root Tips on the Elongation of Excised *Pisum* Epicotyls Cultured in vitro, Plant Physiol. 29: 100—102.
- Jacquot C., 1964, Application de la Technique de Culture des Tissus Végétaux à l'étude de quelques problèmes de la physiologie de l'arbre, Annales des Sciences Forestières 21: 317—473.
- Murashige T., F. Skoog, 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant. 15: 473—497.
- Rogozińska J. H., 1967, Triacanthine, Growth Substances and the in vitro Culture of *Gleditsia triacanthos* L., Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. sci. biol. 15: 313—317.
- Skoog F., C. O. Miller, 1957, w: "Biological Action of Growth Substances", Symposia Soc. Exptl. Biol. nr. 11, Cambridge University Press. s. 118.
- Went F. W., 1938, Specific Factors other than Auxin Affecting Growth and Root Formation, Plant Physiol. 13: 55—80.