

SCREENING OF PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF 6-BENZYLAMINO-PURINE DERIVATIVES IN REGENERATION *IN VITRO*

SCREENING FYZIOLOGICKÉ AKTIVITY DERIVÁTŮ 6-BENZYLAMINO-PURINU V REGENERACI *IN VITRO*

Bradáčová, A., Dundálková, L., Prokešová, Z., Klemš, M. and Procházka, S.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xbradaco@mendelu.cz, klems@mendelu.cz

ABSTRACT

The topic of the work was to study a physiological activity of 6-benzylaminopurine (BA) derivatives in induction of organogenesis *in vitro* adherent to metabolites formed directly in plant tissues, respectively. 6-benzylaminopurine riboside (BAR), 6-benzylaminopurine riboside monophosphate (BAR5'MP) and 6-benzylaminopurine-7-glucoside (BA7G) were applied into MS cultivation medium and the induction of organogenesis was observed in 30 days. The comparable cytokinin activity in induction of organogenesis *in vitro* showed BA and BAR5'MP, less active was BAR. The level of endogenous cytokinins was highest in explants cultivated on the medium with BA and BAR5'MP. The content of chlorophyll during the *in vitro* cultivation decreased in all variants, mainly in explants cultivated on BA7G.

Key words: shoot formation, petunia, cytokinin, chlorophyll

ABSTRAKT

Cílem práce bylo sledovat fyziologickou aktivitu derivátů 6-benzylaminopurinu (BA) v indukci organogeneze *in vitro*, a to látek, které vznikají jako metabolity přímo v rostlinných pletivech. 3 μ M koncentrace 6-benzylaminopurinribosidu (BAR), 6-benzylaminopurinribosid-5'-monofosfátu (BAR5'MP) a 6-benzylaminopurin-7-glukosidu (BA7G) byla aplikována do kultivačního média MS a po dobu 30 dnů byla sledována indukce organogeneze, obsah chlorofylu a endogenních cytokininů. Srovnatelně aktivní s BA byl v indukci organogeneze *in vitro* BAR5'MP, o něco méně aktivní byl BAR. Obsah endogenních cytokininů byl nejvyšší v explantátech kultivovaných na BA a BAR5'MP. Množství chlorofylu při kultivaci *in vitro* klesalo ve všech variantách, nejvýrazněji však na médiu s BA7G.

Klíčová slova: regenerace prýtlů, petunie, cytokininy, chlorofyl

ÚVOD

Cytokinin 6-benzyladenin (BA) je jedním z růstových regulátorů běžně používaných v systémech explantátových kultur k indukci organogeneze *de novo* (VAIBHAV et al. 2001).

Patří mezi nativní aromatické cytokinininy podobně jako *orto*- a *meta*-topolin. Ne u všech rostlin ho za normálních podmínek lze nalézt v hojném množství - jeho přítomnost v pletivech je druhově a orgánově specifická (KAMÍNEK 1992). Aktivita BA koresponduje s intenzitou odbourávání a tvorbou BA konjugátů, s aktivitou rostlině dostupných metabolických systémů měnících sloučeniny BA na jiné cytokininové deriváty. Podle SAKAKIBARY (2006) je u řady případů aplikace exogenních cytokininových konjugátů jejich aktivita dána konverzním poměrem mezi konjugáty a bázemi.

Cytokinininy ovlivňují růst a morfogenezi rostlin prostřednictvím podílu fyziologicky aktivních a inaktivních metabolitů. Jejich exogenní aplikace vede k intenzivnímu metabolismu, ke změnám hladin endogenních cytokininů a k ovlivnění jejich vývoje. K projevům těchto procesů náleží kromě morfogeneze i procesy oddálení senescence a degradace chlorofylu a ovlivnění translokace látek (KAMÍNEK a LUŠTINEC 1978).

Cílem práce bylo srovnat fyziologickou aktivitu derivátů 6-benzylaminopurinu (BAR, BAR5'MP a BA7G) prostřednictvím regenerace *in vitro* a dále obsahu chlorofylu a cytokininů nejenom v primárním explantátu, ale také po období indukce kdy už je viditelná regenerace na explantátech.

MATERIÁL A METODY

Jako donorový experimentální materiál byly použity rostliny petunie (*Petunia hybrida*) cv. Lady blue pěstované *in vitro*. Segmenty ze střední části listů byly kultivovány na čtyřech typech indukčních MS (MURASHIGE a SKOOG 1962) médií obohacených o cytokinin (3 μ M BA, BAR, BAR5'MP nebo BA7G) a auxin (NAA) po dobu 43 dní (buď celou dobu na indukčním médiu nebo s výměnou indukčního média v pátém dni od začátku kultivace). Během této doby byla vyhodnocována frekvence regenerace prýtů (tj. poměr regenerujících segmentů na celkový počet segmentů, vyjádřen v %) v intervalech 0, 5, 14, 17, 19, 24, 28, 34 a 43 dní.

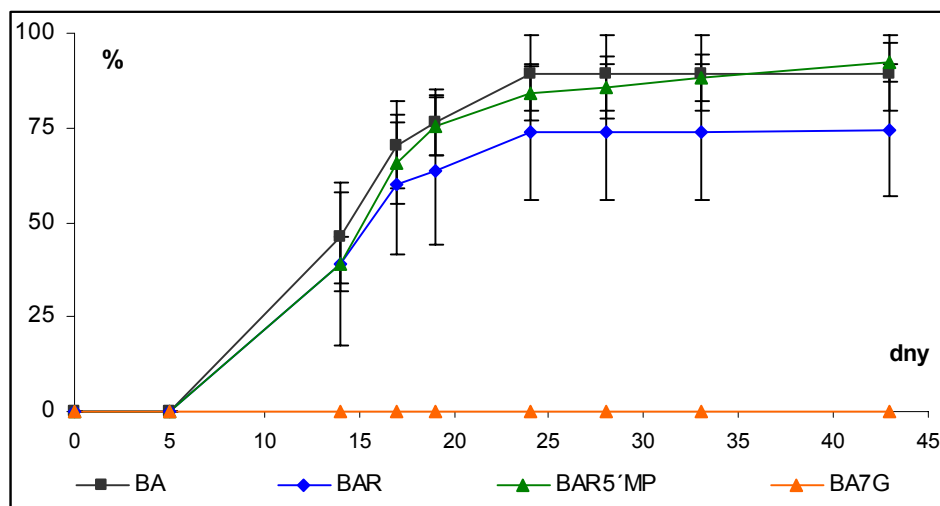
V segmentech listů petunie obohraných v čase 0, 2 hodiny a 43 dní od začátku kultivace na médiu s růstovými regulátory (RR) i bez růstových regulátorů byl stanoven obsah cytokininů pomocí ELISA (STRNAD et al. 1990, STRNAD et al. 1996) po předchozí purifikaci (MACHÁČKOVÁ ET AL. 1993) a HPLC separaci (přístroj firmy Ecom, 25 cm kolona Phenomenex C 18, 5 μ m) . U stejných vzorků byl zjištěn obsah chlorofylů „a“ a „b“ spektrofotometricky dle PORRA et al. (1989).

Pro stanovení frekvence regenerace byly segmenty kultivovány ve 4 opakováních v počtu 10 segmentů na Petriho misku a statisticky vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu. Pro stanovení obsahu cytokininů byly vždy odebrány 2 vzorky rostlinného materiálu od každé varianty a obsah cytokininů byl stanovován v každém vzorku dvakrát. Stejně byla opakování provedena i pro obsah chlorofylu „a“ a „b“.

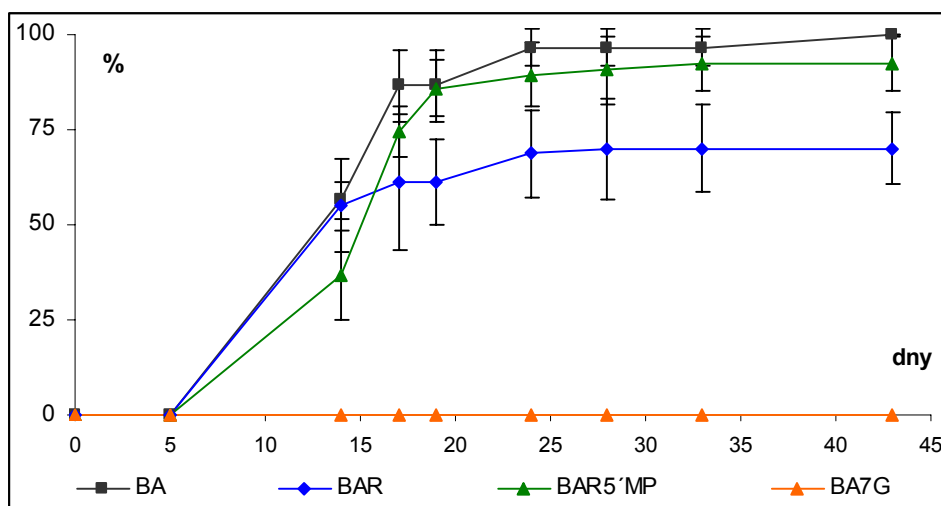
VÝSLEDKY A DISKUSE

Segmenty listů petunii regenerovaly na médiích s BA, BAR a BAR5'MP do desátého dne indukce organogeneze (graf č. 1 a č. 2), jak popsala PROKEŠOVÁ (2002), která kultivovala segmenty listů petunie na médiu s obsahem BA. To je dlouhá doba například ve srovnání se segmenty listů tabáku, které regenerovaly na indukčním médiu s BA ve čtvrtém až šestém dni (DHALIWAL et al. 2003). Výsledky frekvence regenerace prýtů na médiu s obsahem benzyladeninu a jeho derivátů potvrdily předpokládanou cytokininovou aktivitu derivátů BA (graf č.1 a č. 2). Fyziologicky neaktivnějšími sloučeninami byly BA a BAR5'MP, méně aktivní pak BAR (graf č.2). Frekvenci regenerace prýtů na médiu s BA a BAR5'MP zvýšilo přenesení segmentů po 5 dnech od začátku kultivace na nové indukční médium (graf č.2). Sloučenina BA7G byla neaktivní v indukci organogeneze (graf č.1 i č.2).

Graf 1 Frekvence regenerace během kultivace na indukčním médiu s BA, BAR, BAR5'MP a BA7G bez výměny média



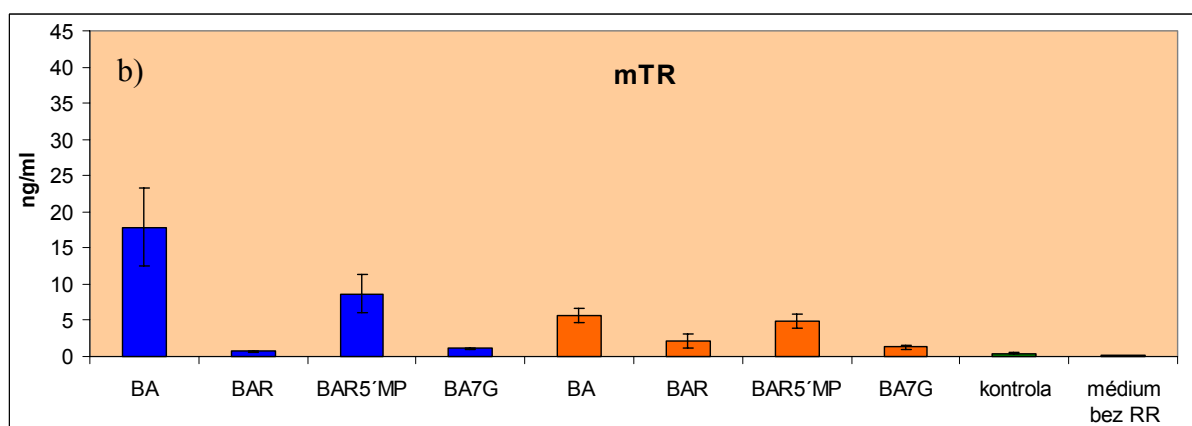
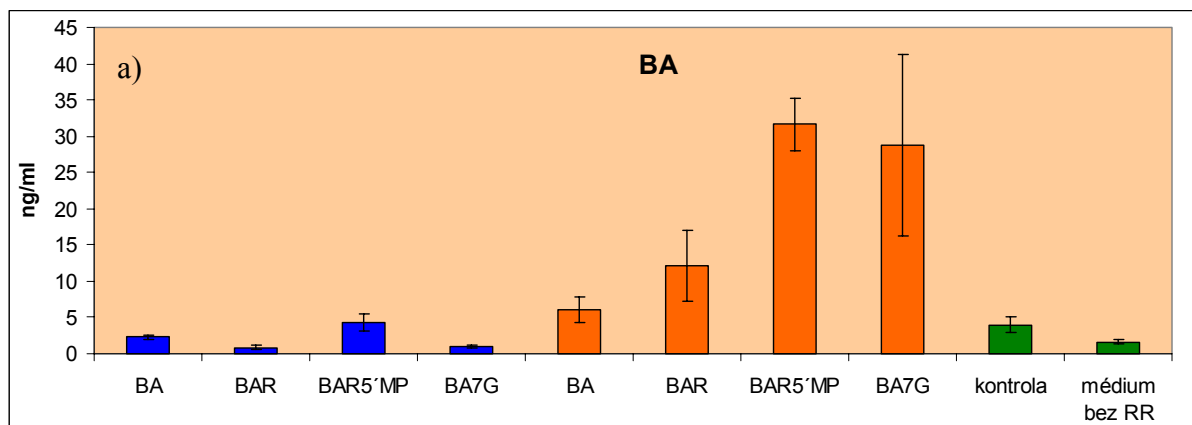
Graf 2 Frekvence regenerace během kultivace na indukčním médiu s BA, BAR, BAR5'MP a BA7G s výměnou média po 5 dnech od počátku kultivace

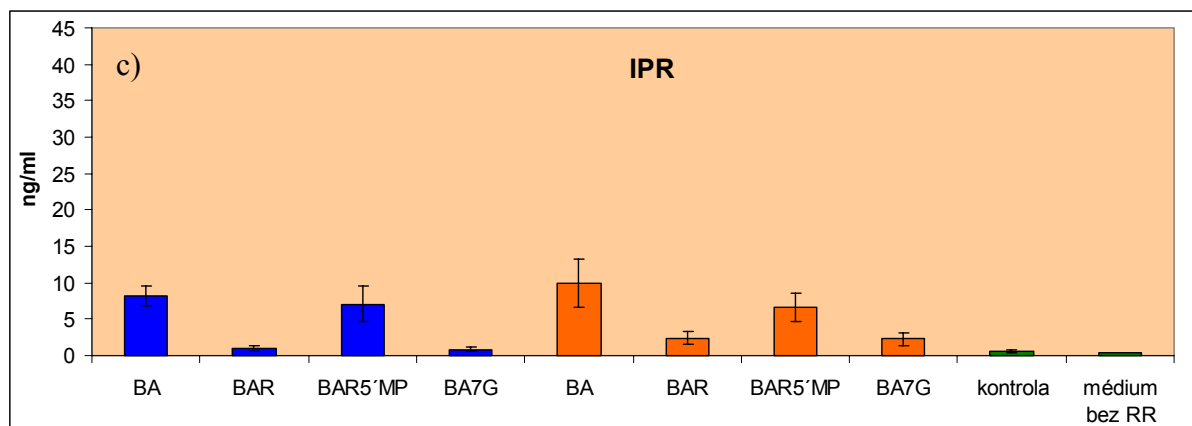


Rychlost příjmu BA a přeměny sloučenin BAR, BAR5'MP a BA7G na BA popisuje Graf č.3a). Segmenty listů petunie ochotně přeměňují přijatý BAR5'MP v benzyladenin už po dvou hodinách kultivace, zatímco při dlouhodobé kultivaci vzniká BA ze všech forem BA konjugátů. Přítomnost BA a BAR5'MP v médiu zvyšuje také hladiny *meta*-topolin ribosidu (mTR) a izopentenyladenin ribosidu (iPR) na počátku i po skončení dlouhodobé kultivace (Graf č.3b a c). Obsah mTR a iPR po příjmu BAR a BA7G je zvýšen jen slabě.

Příjem a metabolismus ³H-BA popisuje ve své práci KLEMŠ et al. (2002). V práci uvádí vznik ³H-BAR, ³H-BA7G a také ³H-BAR5'MP. Popisuje především intenzivní tvorbu ³H-BA7G a s tím spojenou inaktivaci v procesu organogeneze. VLASÁKOVÁ et al. (1998) sice uvádějí, že z BAR může vznikat BA a že příjem BAR je pomalejší než BA. To může korespondovat s nižší organogenní aktivitou ribosidu oproti volnému BA. Biologickou aktivitu BA7G dokládá pouze starší práce autorů FOX et al. (1973).

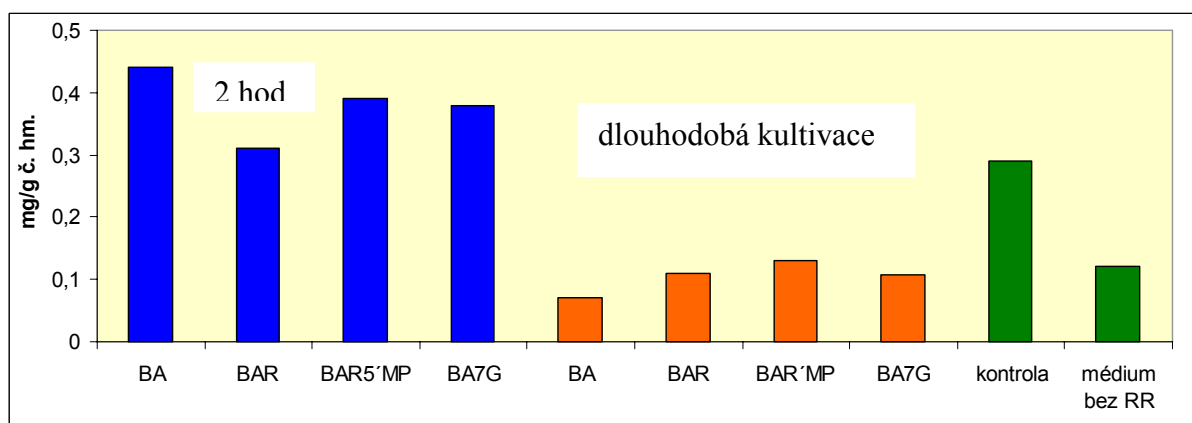
Graf 3 Obsah BA (a), mTR (b) a iPR (c) v segmentech listů petunie kultivovaných na indukčním médiu s BA, BAR, BAR5'MP a BA7G po dobu 2 hodiny (hodnoty značeny modře) a 43 dní (hodnoty značeny oranžově) ve srovnání s kontrolními variantami (hodnoty značeny zeleně) bez kultivace (kontrola) a kultivace na médiu bez růstových regulátorů (médiu bez RR).





Účinek cytokininů na oddálení degradace chlorofylů byl velmi dobře znatelný v případě BA a BAR, také BAR5'MP zachoval v explantátech listová barviva. Po krátkodobé kultivaci segmentů listů došlo na médiích se všemi deriváty BA ke zvýšení obsahu chlorofylu "a". V případě dlouhodobé kultivace se obsah chlorofylu "a" snížil, resp. byla jeho hodnota vysoká stejně jako při kultivaci segmentů bez růstových regulátorů, tak jak to je patrné z grafu č. 4. Rozdíly mezi samotnými deriváty BA v zachování chlorofylu v primárních explantátech ani po regeneraci nebyly významné.

Graf 4 Obsah chlorofylu „a“ v segmentech listů petunie kultivovaných na indukčním médiu s BA, BAR, BAR5'MP a BA7G po dobu 2 hodiny (hodnoty značeny modře) a 43 dní (hodnoty značeny oranžově) ve srovnání s kontrolními variantami (hodnoty značeny zeleně) bez kultivace (kontrola) a kultivace na médiu bez růstových regulátorů (médium bez RR).



ZÁVĚR

Benzylaminopurin je nejpoužívanějším cytokininem pro indukci morfogeneze prýtu v *in vitro* kulturách. Je proto nejčastěji přidávaným růstovým regulátorem v médiích za účelem mikropropagace. Navíc jeho exogenní aplikace mění v explantátech hladiny endogenních cytokininů, které se na indukci morfogenního procesu mohou také podílet.

Z našich výsledků vyplývá, že jeho fyziologický vliv na indukci organogeneze *in vitro* může být nahrazen jeho ribosidem nebo ribosid-5'-monofosfátem, ale nikoliv jeho 7-glukosidem.

POUŽITÁ LITERATURA

DHALIWAL, H.S., RAMESAR-FORTNER, N.S., YEUNG, E.C., and THORPE, T.A. (2003): Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. *Can J Bot* 81: 611-621.

FOX, J.E., CORNETTE, J., DELEUZE, G., DYSON, W., GIERSAK, C., NIU, P., ZAPATA, J. and McCHESNEY, J. (1973): The formation, isolation, and biological activity of a cytokinin-7-glucosid. *Plant Physiol* 52: 627-632.

KAMÍNEK, M. (1992): Progress in cytokin research. *Trends in Biotech.* 10 : 159-164.

KAMÍNEK, M. and LUŠTINEC, J. (1978): Sensitivity of oak leaf chlorophyll retention bioassay to natural and biosynthetic cytokinins *Biol Plant* 20: 377-382.

KLEMŠ, M., BALLA, J., MACHÁČKOVÁ, I., EDER, J., PROCHÁZKA, S. (2000): The uptake and metabolism of ³H-benzylaminopurine in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. *Plant Growth Regul* 31: (135-142).

MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., EDER, J., SEIDLOVÁ, F. and STRNAD, M. (1993): Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiol Plant* 87: 160-166.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol Plant* 15: 473-97.

PORRA, R.J., THOMPSON, W.A. and KRIEDERMANN, P.E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384-394.

PROKEŠOVÁ, Z. (2002): Gradient a transport růstových regulátorů v polární organogenezi *in vitro*. Diplomová práce, Ústav biologie rostlin MZLU Brno.

SAKAKIBARA, H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57: 431-449.

STRNAD, M., VANĚK, T., BINAROVÁ, P., KAMÍNEK, M., HANUŠ, J.: Enzyme immunoassays for cytokinins and their use for immunodetection of cytokinins in alfalfa cell culture. In: *Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development*, pp. 41-54. Ed.: Kutáček, M., Elliot, M.C., Macháčková, I., SPB Academic Publ., The Hague, 1990.

STRNAD, M. (1996): Enzyme immunoassays of N⁶-benzyladenine and N⁶-(*meta*-hydroxybenzyl)adenine Cytokinins. *J Plant Growth Regul* 15, 179-188.

VAIBHAV, T., KAVINDRA, N.T. and BRAHMA, D.S. (2001): Comparative studies of cytokinins on in vitro propagation of *Baccopa monniera*. Plant Cell TissOrgan Cult 66: 9-16.

VLASÁKOVÁ, V., BŘEZINOVÁ, A. and HOLÍK, J.(1998): Study of cytokinin metabolism using HPLC with radioisotope detection. J Pharmad Biomed Anal (17): 39-44.