



Zawiesina komórkowa uzyskana z kalusa oraz bezpośrednio z liścieni *Pharbitis nil* Chois

Alina Trejgell, Justyna Wiśniewska, Andrzej Tretyn

Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Cell suspension obtained from callus or directly from cotyledons of *Pharbitis nil* Chois

Summary

An attempt has been made to obtain cell suspension from callus as well as directly from cotyledons *P. nil*. Cotyledons of 7-days old sterile seedlings and flower buds excised from 3-week old plants were the material for the induction of callus. The explants were laid out on MS medium supplemented with various combination of plant hormones: BAP (5 mg/l) and NAA (1 mg/l) and supplemented with 3% sucrose or 2% glucose and 1% sucrose, BAP (5 mg/l) and IAA (0,5 mg/l), BAP (0,5 mg/l) and Picloram (1 mg/l), BAP (5 mg/l) and Picloram (0,5 mg/l), 2,4-D (0,125 mg/l). The cultures were grown in continuous white light or in darkness. The callus obtained from cotyledons cultivated in darkness and callus from flower buds cultivated in light on MS medium with BAP (5 mg/l), NAA (1 mg/l), 2% glucose and 1% sucrose were proved useful for obtaining cell suspension. Moreover, an attempt was made to obtain cell suspension directly from cotyledons. Cotyledons were cut into small fragments or were subjected to enzymatic digestion. The cell suspensions were cultivated on MS medium with the addition of BAP (5 mg/l) and IAA (0,5 mg/l) on a shaker at 140 rpm. The increase of cell number was determined by counting the cells every 5 days. In the subsequent subcultures, a decrease of the number of cell divisions was observed.

Key words:

suspension cultures, *Pharbitis nil*, callus, cotyledon, flower bud.

Adres do korespondencji

Alina Trejgell,
Zakład Biotechnologii,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet
Mikołaja Kopernika,
ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń.

1. Wstęp

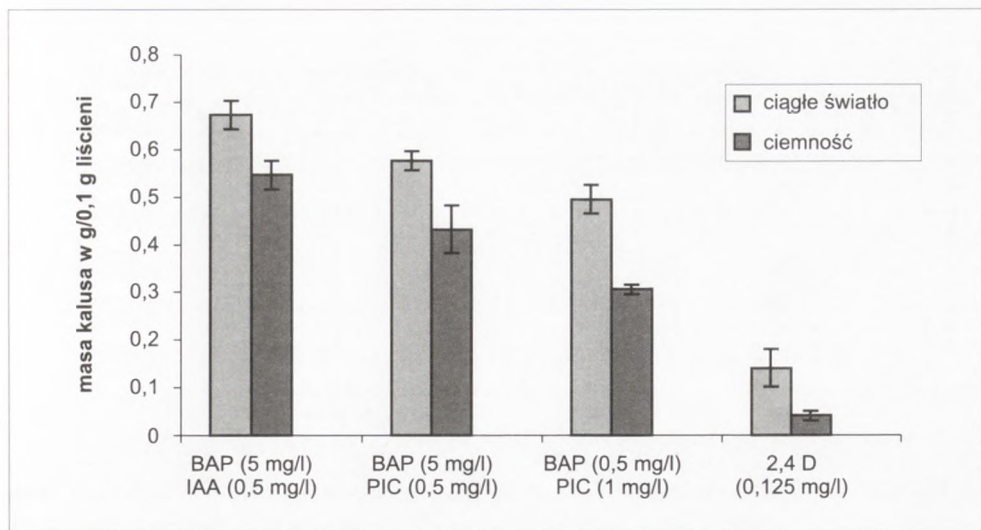
Kultury zawiesinowe stanowią dogodny układ eksperymentalny, umożliwiający badanie mechanizmów szeregu procesów biochemicznych i fizjologicznych w komórkach pozbawionych powiązań występujących w obrębie tkanek oraz specyficznego wzorca zachowań w obrębie organu (1), a także umożliwiają ścisłą kontrolę warunków doświadczalnych (2). Dlatego też opracowanie metody uzyskiwania stabilnych linii zawiesinowych pochodzących z materiału indukowanego i nie indukowanego mogłoby ułatwić prace nad poznaniem natury chemicznej induktora kwitnienia, czy poszczególnych elementów szlaku transdukcji sygnału związanego z procesami prowadzącymi do ewokacji. Celem tej pracy było uzyskanie zawiesiny komórkowej z kalusa indukowanego na fragmentach liścieni i pąkach kwiatowych oraz bezpośrednio z liścieni *P. nil*.

2. Materiały i metody

Zawiesinę komórkową wprowadzono z kalusa oraz bezpośrednio z liścieni *Pharbitis nil*. Materiał wyjściowy do indukcji kalusa stanowiły liścienie 7-dniowych sterylnych siewek oraz pąki kwiatowe izolowane z 3-tygodniowych roślin hodowanych *in vivo*. Fragmenty liścieni (0,25 cm²) wykładano na pożywkę MS uzupełnioną: BAP (5 mg/l) i NAA (1 mg/l) z 3% sacharozą lub 2% glukozą i 1% sacharozą oraz BAP (5 mg/l) i IAA (0,5 mg/l), BAP (0,5 mg/l) i Pikloram (1 mg/l), BAP (5 mg/l) i Pikloram (0,5 mg/l), 2,4-D (0,125 mg/l). Pąki kwiatowe wykładano na pożywki uzupełniane: BAP (5 mg/l) i NAA (1 mg/l) z 3% sacharozą lub 2% glukozą i 1% sacharozą. Hodowle prowadzono w warunkach ciągłego światła lub w ciemności w temperaturze 26°C. Około 5 g tkanki z drugiego pasażu przenoszono do 50 mL płynnej pożywki MS z dodatkiem BAP (5 mg/l) i IAA (0,5 mg/l). Wyprowadzenie zawiesiny bezpośrednio z liścieni dokonano z liścieni pochodzących z 7-dniowych sterylnych siewek (około 3 g), które cięto na drobne fragmenty lub poddawano trawieniu enzymatycznemu (3% pektynaza przez 24 godziny). Zawiesinę hodowano w płynnej pożywce przy ciągłym wytrząsaniu (140 rpm). Po okresie hodowli wstępnej zawiesinę przefiltrowano. Pomiar liczebności komórek (w 3 niezależnych hodowlach) prowadzono co 5 dni. Kolejnych pasaży dokonywano w 25 dniu hodowli, przenosząc 25 mL zawiesiny do 50 mL świeżej pożywki.

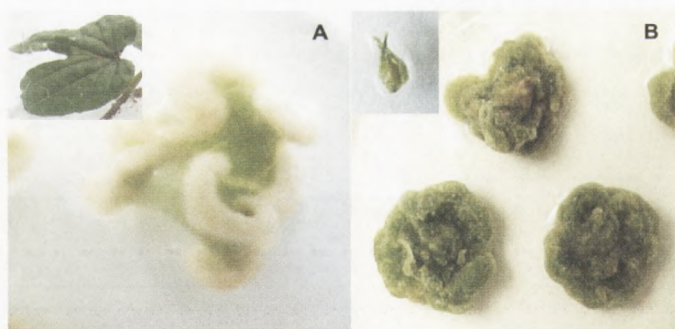
3. Wyniki i dyskusja

Na wszystkich zastosowanych pożywkach stwierdzono rozwój tkanki kalusowej. Jednak w zależności od zastosowanych regulatorów wzrostu oraz źródła węgla zaobserwowano znaczne różnice w ilości, strukturze i barwie uzyskanego kalusa. Dla wie-

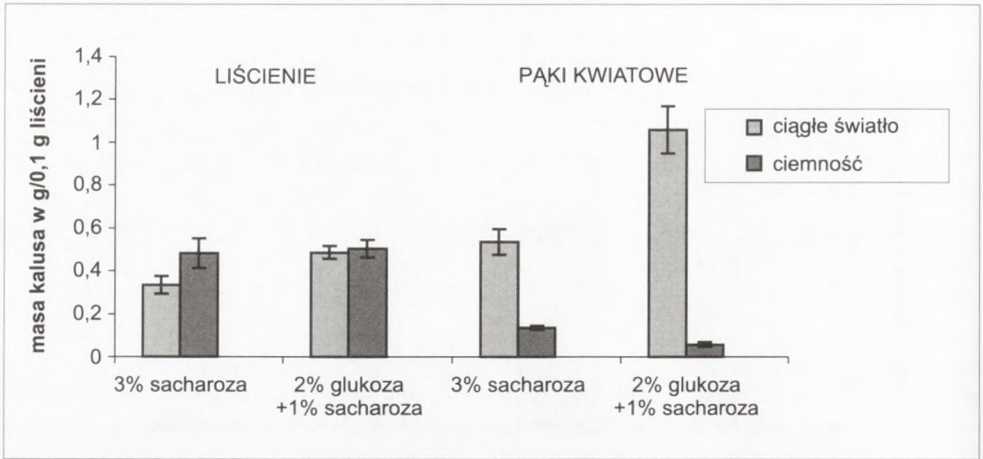


Rys. 1. Wpływ rodzaju pożywy i warunków świetlnych hodowli na wzrost kalusa indukowanego na liścieniach *Pharbitis nil*.

lu gatunków korzystny wpływ zarówno na przyrost masy, jak i odpowiednią do wprowadzenia zawiesiny komórkowej strukturę kalusa wywiera obecność w pożywce pikloramu, np. u *Taxus x media* (3), *Rollinia mucosa* (4), *Rudgea jasminoides* (5), czy 2,4-D, np. u *Opuntia ficus* (6). W przypadku *Pharbitis nil* zastosowanie tych regulatorów wzrostu okazało się mało skuteczne (rys. 1), ponadto kalus szybko brązowieł i obumierał. Kalus indukowany na liścieniach hodowanych w ciemności (fot. 1A) i na świetle oraz na pąkach kwiatowych hodowanych na świetle (fot. 1B) na pożywce



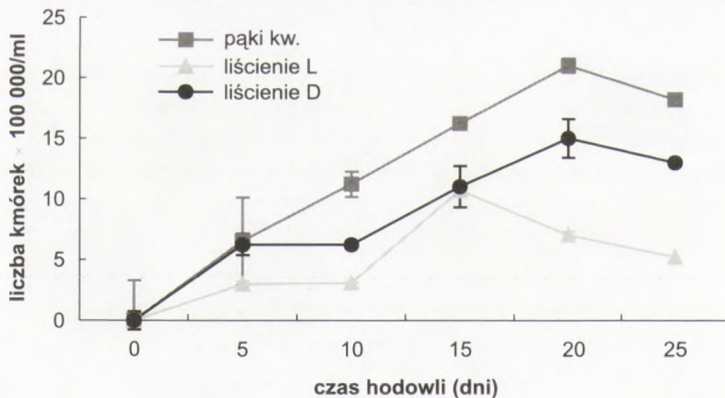
Fot. 1. Kalus indukowany na fragmentach liścieni hodowanych w ciemności na pożywce z dodatkiem BAP (5 mg/l) i IAA (0,5 mg/l) z 3% sacharozą (A) oraz na pąkach kwiatowych hodowanych na świetle na pożywce BAP (5 mg/l) i NAA (1 mg/l) z 1% sacharozą i 2% glukozą (B).



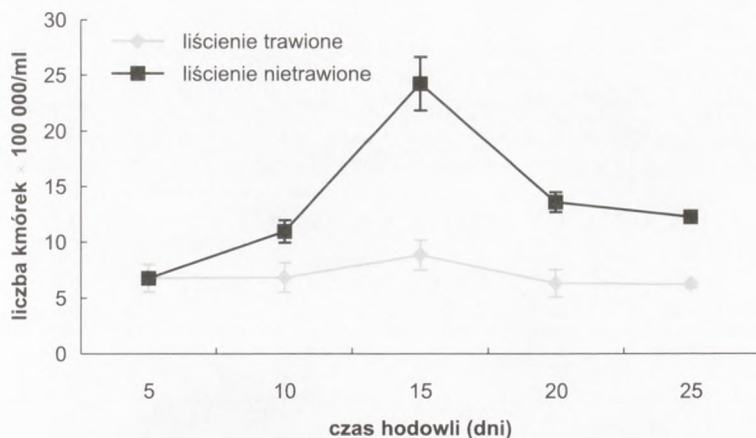
Rys. 2. Wpływ rodzaju cukru w pożywce MS uzupełnionej BAP (5 mg/l) i NAA (1 mg/l) i warunków świetlnych hodowli na wzrost kalusa indukowanego na liściach i pąkach kwiatowych *Pharbitis nil*.

z BAP (5 mg/l) i NAA (1 mg/l) oraz 2% glukozą i 1% sacharozą wykazywał najintensywniejszy wzrost (rys. 2). Dlatego też kalus indukowany w tych warunkach był wykorzystany do wyprowadzenia zawiesiny komórkowej. Stymulujący wpływ glukozy na indukcję i wzrost kalusa zaobserwowano także u *Santalum album* (7), *Cuscuta reflexa* (8).

W cyklu hodowlanym zawiesiny *Pharbitis nil* wyprowadzonej z kalusa indukowanego na liściach stwierdzono występowanie trzech faz wzrostu: spoczynkowej, wzrostu logarytmicznego i stajonarnej (rys. 3). Funkcjonowanie opisanego trójfazowego modelu wzrostu zawiesiny, stwierdzono również u innych gatunków, takich



Rys. 3. Krzywe wzrostu hodowli zawiesinowych w II pasażu wyprowadzonych z kalusa indukowanego na pąkach kwiatowych i liściach *Pharbitis nil* w warunkach ciągłego dnia (L) lub w ciemności (D).



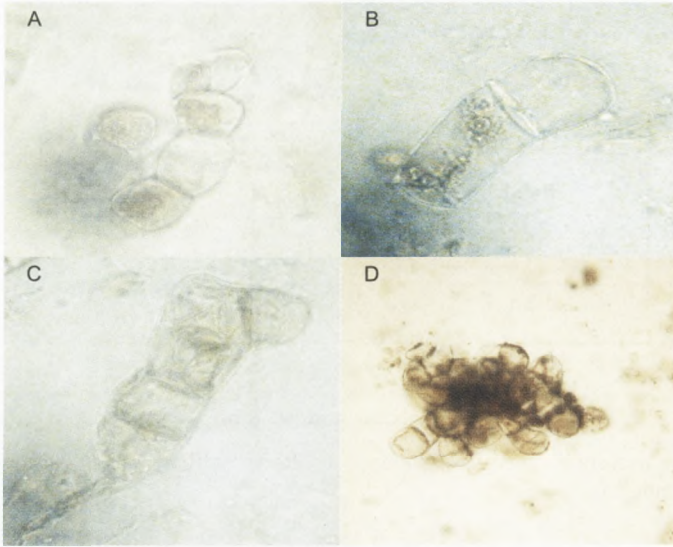
Rys. 4. Krzywa wzrostu hodowli zawiesinowych uzyskanych z liścieni *Pharbitis nil* poddanych trawieniu enzymatycznemu i nietrawionych.

jak: *Digitalis thapsi* (9), czy *Daucus carota* (10). Natomiast w zawieszynie komórkowej uzyskanej z kalusa pochodzącego z pąków kwiatowych nie zaobserwowano fazy spoczynkowej, podobnie jak w cyklu wzrostowym zawiesin *Lycopersicon esculentum* (11). W uzyskanych hodowlach obserwowano zarówno pojedyncze komórki jak i agregaty kilku- i kilkunastokomórkowe (fot. 2A i C). Agregaty składające się z większej liczby komórek obserwowano w hodowlach wyprowadzanych z kalusa hodowanego na świetle (fot. 2D), co wskazuje na stosunkowo zwartą strukturę kalusa uzyskiwanego w tych warunkach hodowlanych. Udział procentowy frakcji agregatów w zawieszynie zmniejszał się wraz z wiekiem hodowli.

Kulturę zawiesinową wyprowadzano również bezpośrednio z liścieni. Liście pocięto skalpelem na fragmenty ($\approx 1 \text{ mm}^2$) i umieszczono w płynnej pożywce takiej jak w przypadku kalusa. Podobną procedurę zastosowano dla *Chenopodium rubrum* (1) i *Catharantus roseus* (12). W hodowli wstępnej oprócz pojedynczych komórek i 2-3 komórkowych agregatów (fot. 2B) zaobserwowano intensywny rozwój kalusa na fragmentach liścieni, charakteryzującego się zwartą strukturą.

Próba uzyskania zawiesiny komórkowej z liścieni poddanych trawieniu nie powiodła się. Otrzymana kultura komórek zawieszona w pożywce zastosowanej dla innych wariantów doświadczenia nie podejmowała podziałów komórkowych (rys. 4).

Z analizy wyników liczebności komórek od trzeciego do piątego pasażu (dane nie publikowane) przeprowadzonych dla wszystkich uzyskanych kultur zawiesinowych wynika, że tempo podziałów komórkowych stopniowo maleje. W celu uzyskania stabilnej kultury zawiesinowej *Pharbitis nil* wyprowadzonej zarówno z kalusa jak i bezpośrednio z liścieni wymagana jest dalsza optymalizacja warunków hodowli zawiesiny.



Fot. 2. Agregaty kilkukomórkowe i kilkunastokomórkowe w zawieszynie komórkowej wyprowadzanej z kalusa indukowanego na fragmentach liścieni (A), bezpośrednio z fragmentów liścieni (A), bezpośrednio z fragmentów liścieni (B) oraz z kalusa indukowanego na pąkach kwiatowych (C i D).

Literatura

1. Geile W., Wagner E., (1980), *Plant, Cell and Environment*, 3, 141-148.
2. Zenkteler M., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, PWN, Warszawa.
3. Furmanowa M., Głowniak K., Sykłowska-Baranek K., Górska G., Józefczyk A., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 75-79.
4. Figueiredo S., Simoes C., Albarello N., Campos Viana V., (2000), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 85-92.
5. Stella A., Braga M., (2002), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 271-276.
6. Llamoca-Zarate R. M., Studart-Guimaraes C., Landsmann J., Campos F., (1999), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 155-157.
7. Sarangi B. K., Golart A., Rekna I., (2000), *Journal of Medicinal & Aromatic Plant Sciences*, 22, 322-329.
8. Srivastava S., Dwivedi U., (2001), *Plant Physiol & Biochemistry*, 39, 529-538.
9. Cacho M., Moran M., Tarrago J. F., Corchette P., (1995), *Plant Cell Reports*, 14, 786-789.
10. Fallon K. M., Philips R., (1988), *Plant Physiol.*, 88, 224-227.
11. Nover L., Kranz E., Scharf K. D., (1982), *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 177, 483-499.
12. Zhao I., Zhu W., Hu Q., Guo Y., (2000), *Biotechnology Letters*, 22, 1227-1231.