



Kinetyka wzrostu zawiesiny pszenicy (*Triticum aestivum* L.) w zależności od stężenia sacharozy w pożywce

Izabela Marcińska, Maria Filek, Jolanta Biesaga-Kościelniak,
Marta Pilipowicz

Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, Polska Akademia Nauk,
Kraków

Growth kinetics of suspension culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) influenced by sucrose concentration in the medium

Summary

The suspension culture was initiated from callus derived from immature inflorescences of winter wheat var Almari. The aim of our investigation was evaluation of the influence of twice increased sucrose concentration in the medium on the physicochemical properties and cell morphology during 15 days of suspension culture. The number of cells, volume, weight, shape and viability were monitored in a few day intervals. Moreover, pH, conductivity and osmolality of medium were measured. The suspensions that were maintained in media containing 30 and 60 g of sucrose per dm^3 were characterised by a similar cell viability and growth kinetics tendency. However, from the 4th day of culture, increased concentration of sucrose inhibited the cell proliferation rate. This effect was associated with decreased volume and dry weight of cells, which indicates that sucrose influences the production of cell biomass. The morphological character of cells was independent of the sucrose concentration, the cell area and circularity changed similarly for both media. The area was increased and circularity decreased. Increased concentration of sucrose resulted in lowered pH of the medium during the whole culture period. There was no statistically significant influence of sucrose on the conductivity and osmolality changes in media. The results suggest that higher level of sucrose in the medium can be disadvantageous for growth kinetics of wheat suspension. It was not connected with medium osmotic potential changes or cell-medium ion exchange possibilities.

Adres do korespondencji

Izabela Marcińska,
Zakład Fizjologii Roślin
im. F. Górskiego,
Polska Akademia Nauk,
ul. Podłużna 3,
30-239 Kraków;
e-mail:
i.marcinska@zfr.pan.
krakow.pl

biotechnologia

2 (53) 104–110 2001

Key words:

growth kinetics, suspension, sucrose, wheat.

1. Wstęp

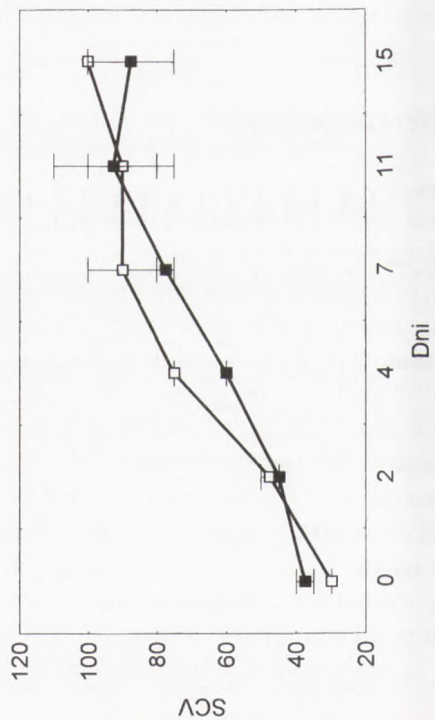
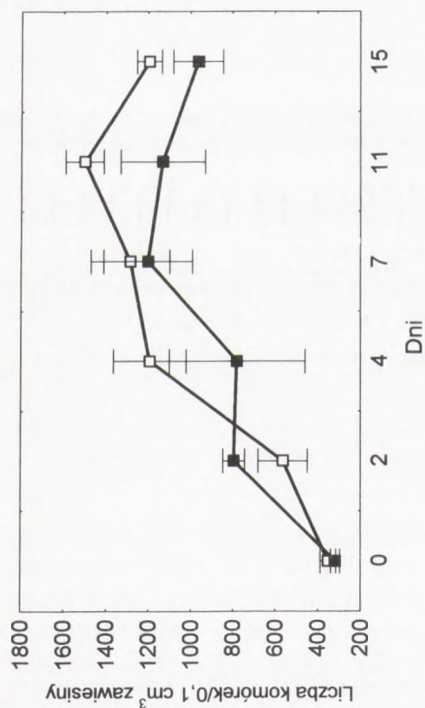
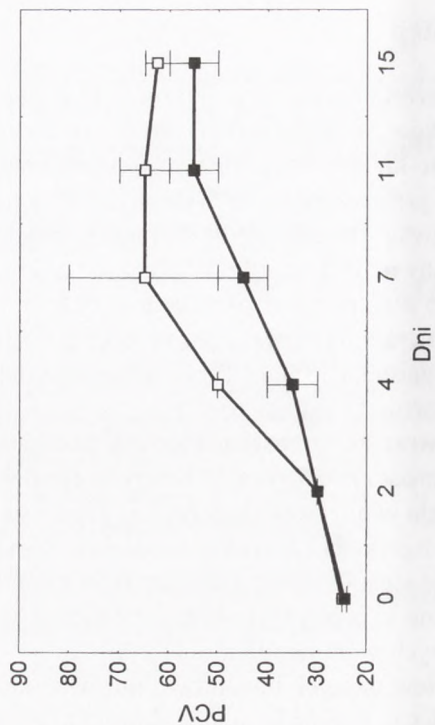
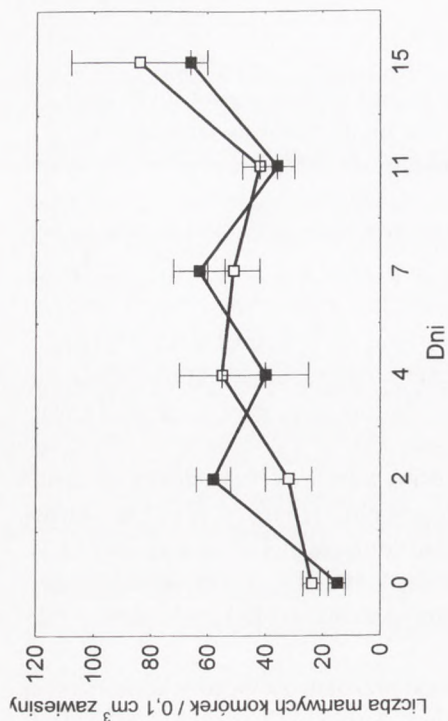
Zawiesinę pszenicy, najczęściej inicjuje się z kalusa uzyskanego z niedojrzałych zarodków, a także wykorzystuje się do tego celu niedojrzałe kwiatostany (11,7). Wzrost kultury zawiesinowej jest charakteryzowany w kilkudniowych odstępach czasu poprzez pomiary wybranych parametrów związanych zarówno z tkanką jak i pożywką. Określa się liczbę, masę, objętość komórek, jak również ich żywotność i zmiany morfologiczne. W pożywce zaś mierzy się przede wszystkim pH, przewodnictwo elektryczne i osmolalność (4,6,8). Wartość pH zwykle maleje w pierwszych dniach cyklu hodowlanego, a następnie osiąga wartość wyższą, niezależnie od badanego gatunku (8,9,4). Przewodnictwo elektryczne i osmolalność, które wiążą się z zawartością składników mineralnych i węglowodanów w pożywce, obniżają wartości wraz ze wzrostem biomasy zawiesiny (8,4).

Wzrost i różnicowanie heterotroficznej zawiesiny komórek jest zależny od źródła węgla w pożywce. Najczęściej używa się do tego celu sacharozy, która w porównaniu z glukozą czy fruktozą zwiększa efektywność somatycznej embriogenezy (3,1). Zwykle stosuje się 30 g sacharozy w 1 dm³ pożywki (7,10,2,13,11,12). Jednak podejmowane są próby testowania w hodowli większego zakresu stężeń sacharozy, a także innych węglowodanów (1,3,5).

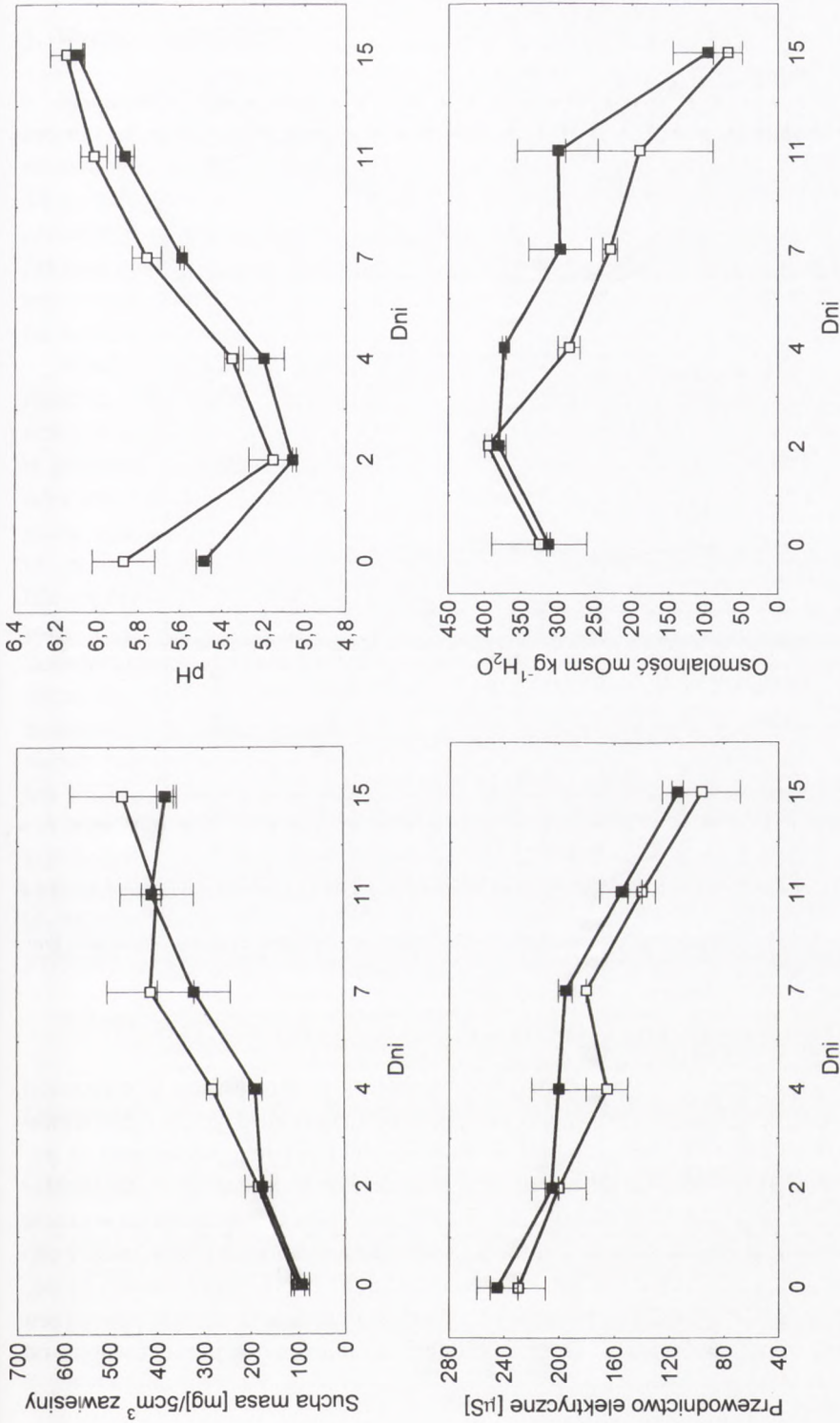
Celem naszych badań było porównanie kinetyki wzrostu zawiesiny komórkowej pszenicy w obecności standardowej (30 g/dm³) i dwukrotnie podwyższonej (60 g/dm³) zawartości sacharozy. Badania miały charakter wstępny, związane były z optymalizacją warunków embriogennej, długoterminowej kultury zawiesinowej pszenicy.

2. Materiał i metody

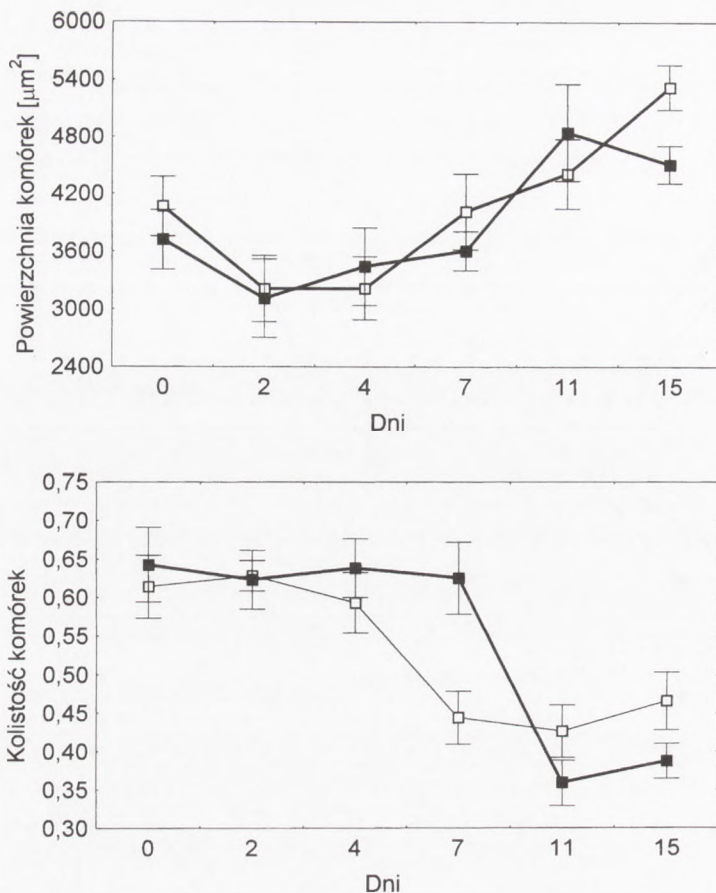
Niedojrzałe kwiatostany o długości 5-10 mm pszenicy ozimej odmiany Almari cięto na drobne fragmenty i wykładano na stałą pożywkę wg Murashige i Skooga (1962), zawierającą 2 mg/dm³ 2,4-D i 30 g sacharozy (MS2). Indukcję kalusa prowadzono w komorze hodowlanej w 25°C i przy 16-godzinnym fotoperiodzie. Kalusy pasażowano na świeże pożywki MS2 co 4 tygodnie. Dwumiesięczne tkanki (po 0,5 g) rozdrobionych kalusów umieszczano w 300 cm³ kolbkach Erlenmayera zawierających 50 cm³ płynnej pożywki MS2. W czasie dwóch kolejnych pasaży, zawiesiny uzupełniano o dalsze 25 cm³ świeżej pożywki MS2. Poziome, z ruchem kołowym, wytrząsanie (60 rpm/min) odbywało się w komorze hodowlanej, w temperaturze 28°C, na słabym świetle jarzeniowym (4 W/m²s⁻¹), przy 16-godzinnym fotoperiodzie, z prędkością 60 obr/min. W odstępach dwutygodniowych dokonywano pasaży zawiesin na świeże pożywki. Sześciotygodniowe zawiesiny podczas kolejnych dwóch pasaży uzupełniono pożywką zawierającą 30 lub 60 g/dm³ sacharozy i po trzecim pasażu poddano analizie wzrostu. Analizę wzrostu prowadzono w ciągu 15 dni hodowli, w kilkudniowych odstępach czasu. Określono: liczbę i objętość komórek



Rys. 1A. Kinetyka wzrostu kultury zawiesinowej pszenicy ozimej odm. Almari w ciągu 15 dni hodowli na pożywce MS2 zawierającej różnicowane stężenie sacharozy. Na wykresach cząstkowych linie zaznaczone symbolem □ – oznaczają zawartość 30 g/dm³, natomiast symbolem ■ – 60 mg/dm³.



Rys. 1B. Kinetyka wzrostu kultury zawiesinowej pszenicy ozimej odm. Almari w ciągu 15 dni hodowli na pożywce MS2 zawierającej zróżnicowane stężenie sacharozy. Na wykresach cząstkowych linie zaznaczone symbolem □ – oznaczają zawartość 30 g/dm³, natomiast symbolem ■ – 60 mg/dm³. Uwaga: wyniki dotyczące zmian osmolalności w pożywce zawierającej 30 g sacharozy w 1 dm³ zostały pomnożone przez 2, dla większej przejrzystości tendencji zmian w porównaniu z podwyższoną do 60 g sacharozy.



Rys. 2. Morfologia komórek (powierzchnia i ich kulistość) w kulturze zawieszinowej pszenicy ozimej odm. Almari w ciągu 15 dni hodowli na pożywce MS2 zawierającej zróżnicowane stężenie sacharozy. Na wykresach cząstkowych linie zaznaczone symbolem \square – oznaczają zawartość 30 g/dm³, natomiast symbolem \blacksquare – 60 mg/dm³.

(SCV i PCV) oraz ich suchą masę. Żywotność komórek kontrolowano w obecności błękitu Evansa. W pożywkach mierzono pH, przewodnictwo elektryczne (μS) i osmolalność ($\text{mOsm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$). Pomiaru przewodnictwa elektrycznego wykonano za pomocą CONDUCTIVITY METER OK – 102 /1, a osmolalność MEMORY – OSMOMETER 020 AT; P.Z. INTECH. Charakterystykę zmian morfologicznych zawiesin w czasie hodowli (powierzchnia i kulistość komórek) sporządzano na podstawie analizy obrazu według programu LUCIA G/Comet – wersja 3,52a. Wyniki opracowano za pomocą programu STATISTICA – wersja 5.0. Wartości średnie z trzech powtórzeń mierzonych parametrów wraz ze średnim błędem standardowym przedstawiono na rysunkach 1A, 1B i 2.

3. Wyniki i dyskusja

W czasie 15 dni kultury zaobserwowano podobną tendencję przyrostu liczby komórek, ich objętości i suchej masy dla zawiesin hodowanych na pożywkach ze zróżnicowanym poziomem sacharozy. Jednakże dla standardowej pożywki, zawierającej 30 g sacharozy w 1 dm³, parametry przyjmowały wyższe wartości, począwszy od czwartego dnia kultury (rys. 1A). Podobne wyniki uzyskano dla *Cajanus cajan* (1) oraz *Triticum aestivum* L. (3). Podwyższeniu ilości sacharozy do 60 g w 1 dm³ pożywki towarzyszyło obniżenie pH, co świadczy, że w tym środowisku nastąpiło przyspieszone wydzielanie się jonów wodorowych do pożywki.

Według Morard i in. (9) na podstawie badań przeprowadzonych na *Saponaria officinalis* L., większemu alkalizowaniu pożywki towarzyszy niskie stężenie jonów amonowych i wysoka wartość stosunku jonów azotanowych do amonowych. Zatem w pożywce o wyższym potencjale osmotycznym może nastąpić szybsze zużycie jonów amonowych. W prezentowanych badaniach, na *Triticum aestivum* L. obserwowano spadek osmolalności i przewodnictwa elektrycznego (rys. 1B), podobnie jak w czasie hodowli embriogennych kultur zawiesinowych innych gatunków (4,6,8). Dla stężenia 30 g sacharozy w 1 dm³, linie spadku obu tych parametrów przyjmowały niższe wartości niż dla pożywki zawierającej dwukrotnie więcej sacharozy. Podwyższenie stężenia cukru w pożywce hamowało zatem zużycie z niej związków mineralnych i energetycznych. Tendencja zmian powierzchni komórek w czasie hodowli była niezależna od stężenia sacharozy w pożywce (rys. 2). W badanych zawiesinach następowało początkowo zmniejszenie powierzchni komórek, a następnie ich 1,5-krotny wzrost, co można wiązać z utratą charakteru embriogennej komórki (rys. 2). Fakt ten potwierdza obserwowane pod mikroskopem zmniejszenie ich kulistości, w wyniku powstawania komórek wydłużonych, co charakteryzuje komórki nieembriogenne. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że do prowadzenia długoterminowej zawiesiny korzystniejsze jest stosowanie standardowej pożywki zawierającej 30 g sacharozy w 1 dm³.

Badania były dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych, grant nr 5 P06A 021 15.

Literatura

1. Anbazhagan V. R., Ganapathi A., (1999), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 56, 179-184.
2. Borelli G. M., Lupotto E., Locatelli F., Wittmer G., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 296-299.
3. Eapen S., Rao P. S., (1985), *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 94, 33-40.
4. Find J. I., Norgaard J. V., Krogstrup P., (1998), *J. Plant Physiol.*, 152, 510-517.
5. Fellers J. P., Guenzi A. C., Taliaferro C. M., (1995), *Plant Cell Rep.*, 231-237.
6. Kwok K. H., Tsoulpha P., Doran P., (1992), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 29, 93-99.
7. Li., Xia, Chen H., (1992), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 28, 79-85.
8. Lullsdorf M. M., Tautorus T. E., Kikcio S. I., Dunstan D. I., (1992), *Plant Sci.*, 82, 227-234.
9. Morard P., Fulcheri C., Henry M., (1998), *Plant Cell Rep.*, 18, 260-265.

10. Qiao Y., Cattaneo M., Locatelli F., Lupotto E., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 262-265.
11. Pauk J., Kertesz Z., Jenes B., Purnhauser L., Manninen O., Pulli S., Barabas Z., Dudits D., (1994), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38, 1-10.
12. Redway F. A., Vasil V., Vasil I. K., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 714-717.
13. Vasil V., Redway F., Vasil I. K., (1990), *Research, rep. from Bio/Technology*, 8, 429-434.