



## Uzyskiwanie zawiesin komórkowych *Pharbitis nil*

Iwona Szyp, Andrzej Tretyn

Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

### Suspension cultures of *Pharbitis nil*

#### Summary

Suspension cultures are more suitable for physiological, biochemical and molecular investigations than callus cultures grown on solid media, because the former provide more homogeneous system than the latter ones. A large number of plants were found suitable for establishing cell suspension cultures. In this study we describe the obtaining of cell suspension cultures derived from callus induced from cotyledons of *Pharbitis nil*. Explants isolated from plants grown under inductive and non-inductive conditions were cultured on MS basal medium containing various concentrations and combinations of growth regulators. To initiate the cell suspension culture, small clumps of friable callus obtained from cotyledons were suspended in liquid callusing medium. An initial inoculum density was  $2 \times 10^4$  cells/ml. Every 20 days the cultures were transferred to a fresh medium. The cell number in suspension was determined by direct microscopic counting with haemocytometr. The cell suspension cultures contained both single cells and small cell aggregates.

#### Key words:

suspension cultures, *Pharbitis nil*, callus, photoperiodic induction.

#### Adres do korespondencji

Iwona Szyp,  
Zakład Fizjologii  
i Morfogenezy Roślin,  
Uniwersytet Mikołaja  
Kopernika,  
ul. Gagarina 9,  
87-100 Toruń.

### 1. Wstęp

Zawiesiny komórkowe dostarczają idealnego systemu eksperymentalnego do badań fizjologicznych i biochemicznych podstaw morfogenezy roślin. Warunki takie sprzyjają ustabilizowaniu się funkcji metabolicznych hodowanej populacji komórek. Stwarza to, jak dotąd, nie spotykane w przypadku innych układów doświadczalnych możliwości poznania procesów morfogenetycz-

nych i badania odpowiedzi fizjologicznych na bodźce zewnętrzne. Celem prezentowanej pracy było otrzymanie kultury zawieszinowej z kalusa powstałego na zaindukowanych i nie poddanych fotoperiodycznej indukcji liścieniach *Pharbitis nil*.

## 2. Materiały i metody

Doświadczenia prowadzono na roślinie dnia krótkiego *Pharbitis nil* Choisy. Pięciodniowe siewki, pochodzące z kultur sterylnych, poddawano indukcji fotoperiodycznej (16 godz. ciemności). W pełni rozwinięte liścienie pochodzące z nie zaindukowanych i zaindukowanych 7-dniowych siewek były źródłem eksplantatów dla hodowli kalusowych. Liścienie cięto skalpelem na fragmenty wielkości 0,5 cm<sup>2</sup> wykładano na pożywkę Murashige i Skoog (1962), wzbogaconą hormonami w 2 wariantach:

- NAA (0,5 mg/L) oraz kinetyna (0,25 mg/L),
- NAA i BAP (0,5 mg/L).

Pasażu tkanki kalusowej dokonywano w odstępach 20-dniowych na świeżo sporządzone pożywki wzrostowe. Podłoża te zawierały sole mineralne i witaminy w ilościach stosowanych w pożywce inicjacyjnej, natomiast użytymi regulatorami wzrostu były:

- IAA (2 mg/L), kinetyna (0,2 mg/L),
- NAA (0,5 mg/L), kinetyna (0,25 mg/L),
- NAA (0,5 mg/L), kinetyna (0,125 mg/L) + 2 × standard Ca<sup>2+</sup>.

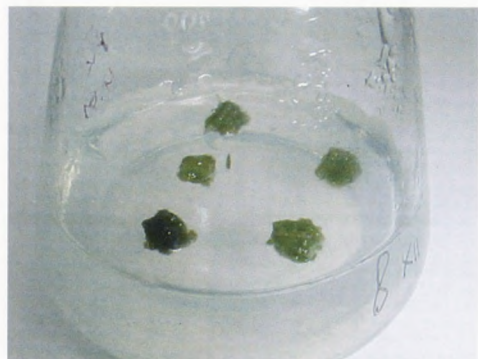
Hodowle prowadzono na ciągłym świetle w temperaturze 26°C.

Sypki, kruchy kalus otrzymany po drugim pasażu posłużył do wyprowadzenia zawiesiny komórkowej. 2-3 g tkanki przenoszono do 45 mL płynnej pożywki. Stężenia soli mineralnych, witamin i hormonów były identyczne jak w pożywce wzrostowej dla tkanki kalusowej. Kultury zawieszinowe prowadzono w warunkach ciągłego wstrząsania (140 rpm) w ciemności, w temperaturze 25°C. Po okresie hodowli wstępnej zawiesinę przefiltrowano. Kolejnych pasaży dokonywano w dwudziestym dniu cyklu hodowlanego, przenosząc 10 mL zawiesiny do 45 mL świeżej pożywki.

## 3. Wyniki i dyskusja

Na wszystkich stosowanych podłożach hodowlanych stwierdzono rozwój tkanki kalusowej. Jednakże w zależności od podłoża zaznaczyły się pewne różnice w barwie i strukturze narastającego kalusa. Kalus rozwijający się na pożywce MS ze standardową ilością wapnia był ciemnozielony i zbity (fot. 1). Natomiast tkanka kalusowa hodowana na podłożu MS z podwójną ilością wapnia w stosunku do standardu była krucha i jasnozielona (fot. 2). Ponadto zaobserwowano, że im mniejsze było w pożywce stężenie cytokinin w stosunku do auksyn, tworzący się kalus był bardziej kruchy. Obie auksyny: IAA i NAA, przy współdziałaniu kinetyny stymulowały szybko





Fot. 1. Kalus wykładany na pożywkę MS ze standardową ilością wapnia.



Fot. 2. Hodowla kalusa na pożywkę MS z podwójną ilością wapnia w stosunku do standardu.

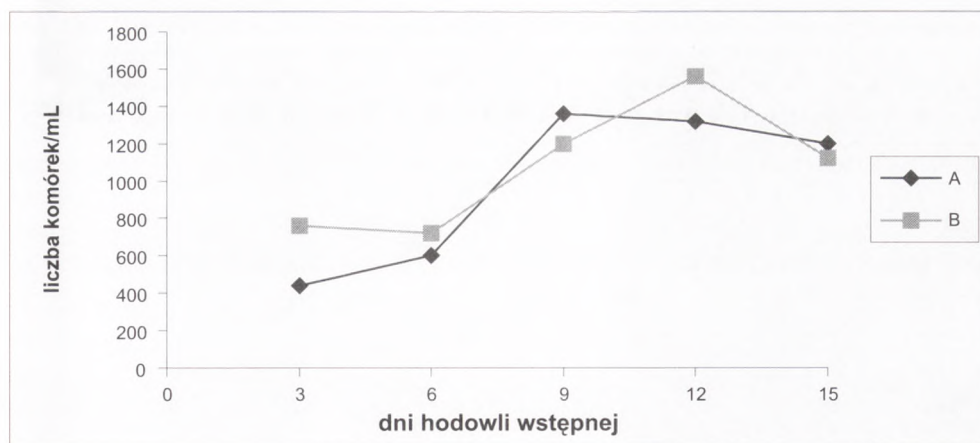


Fot. 3. Dzielące się komórki w kulturze zawiesinowej *Pharbitis nil*, obserwowane podczas wstępnej fazy hodowli.



Fot. 4. Pojedyncze komórki w hodowli zawiesinowej *Pharbitis nil*.





Rys. 1. Krzywa wzrostu populacji komórek w zawieszynie *Pharbitis nil* wyprowadzonej z kalusa pochodzącego z nie zaindukowanych (A) i zaindukowanych liści (B).

wzrost tkanki kalusowej, która jednak po okresie intensywnego wzrostu brązowieła i zamierała. Efektu takiego nie obserwowano na podłożu zawierającym w miejsce kinetyny BAP.

Do wyprowadzenia kultury zawieszinowej posłużył sypki, dwukrotnie pasażowany kalus. W trakcie trwania cyklu hodowlanego (15 dni) dokonano pomiarów liczebności komórek w zawieszynie. W uzyskanych hodowlach obserwowano agregaty składające się z kilku lub kilkunastu komórek (fot. 3) oraz pojedyncze komórki (fot. 4). Krzywą wzrostu populacji komórek wykreślono na podstawie średniej liczebności, mierzonej w pięciu równolegle prowadzonych hodowlach.

Hodowla wstępna zawiesziny uzyskanej z dwóch typów kalusa prowadzona była na podłożu MS z takim zestawem regulatorów wzrostu jaki był wykorzystany do hodowli poszczególnych rodzajów kalusa. Podobne podejście metodyczne stosowano w hodowli wstępnej zawiesziny komórkowej *Digitalis thapsi* (1) i *Pisum sativum* (2).

W cyklu hodowlanym badanej zawiesziny *Pharbitis nil* stwierdzono występowanie trzech faz wzrostu: a) spoczynkowej, b) wzrostu logarytmicznego i c) stacjonarnej. Występowanie opisanego trójfazowego modelu wzrostu zawiesziny, zaobserwowano również u takich roślin, jak: *Nicotiana glauca* (3) i *Daucus carota* (4).

Nie stwierdzono istotnych różnic w dynamice wzrostu zawiesin uzyskanych z kalusa powstałego z liści nie indukowanych i fotoperiodycznie zaindukowanych siewek *Pharbitis nil*. Stwarza to możliwość użycia obu typów zawiesin komórkowych do badania chemicznej natury induktora kwitnienia.

Praca powstała w trakcie realizacji grantu J.M. Rektora Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu.



## Literatura

1. Cacho M., Morán M., Tárrago J. F., Corchette P., (1995), *Plant Cell Reports*, 14, 786-789.
2. Broejsza-Wysocki W., Broejsza- Wysocka E., Hrazdlina G., (1997), *Plant Cell Reports*, 16, 304-309.
3. Bonner C. A., Kenyon C., Jensen R. A., (1988), *Physiol. Plant.*, 74, 1-10.
4. Fallon K. M., Phillips R., (1988), *Plant Physiol.*, 88, 224-227.