



Kultury protoplastów *Gentiana kurroo* Royle

¹Fiuk A., ²Rajkiewicz M., ¹Rybczyński J.J.

¹Ogród Botaniczny – CZRB PAN, Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa; ²Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn

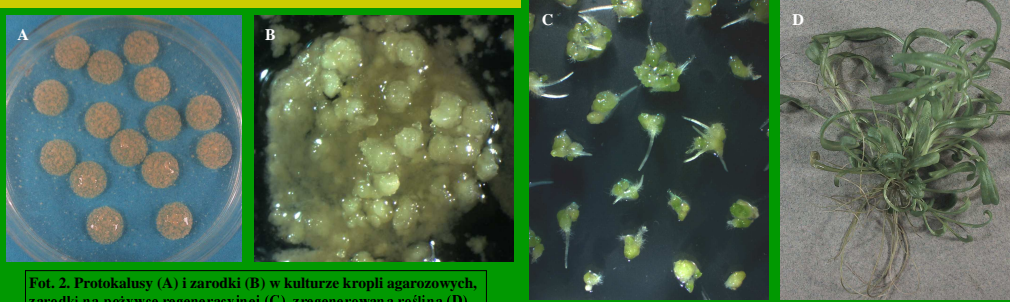
WSTĘP

Wieloletnie badania różnych gatunków roślin z rodzaju *Gentiana* w kulturach *in vitro* wykazały wysokie zdolności morfogenetyczne ich tkanek i organów. Uzyskanie zawiesin komórkowych o wysokich zdolnościach embriogenicznych stanowiło podstawę do przeniesienia eksperymentów z poziomu tkankowego na komórkowy. Protoplast, czyli komórka pozbawiona ściany komórkowej, w sensie struktury, zorganizowania i funkcjonowania stanowi ostateczną formę, na której można przeprowadzać eksperymenty dotyczące regeneracji roślin.

CELEM PRACY było uzyskanie embriogenicznych protokółów zawiesin komórkowych i protoplastów mezofilu zielonych liści *G. kurroo* poprzez ich izolację i kulturę.

MATERIAŁY I METODY

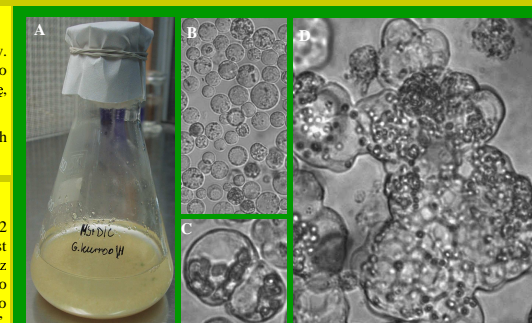
Materiał do badań stanowiły roczne zawiesiny komórkowe pochodzenia hypokotylowego i liściennego (Fot.1A) namazane na pożywkach CSM1 i CSM2 (Tab.1) oraz rośliny z kultur aksenicznych. Przed rozpoczęciem trawienia zawiesiny dzielono na trzy frakcje: 150-300 µm, 300-500 µm i >500 µm, natomiast liście epilowano. Po odważeniu 1g tkanki zalewano ją 10ml odpowiedniej mieszanki enzymów (Tab.2). Enzymy sporządzano na bazie roztworu CPW z dodatkiem 9% mannitolu (CPW9) i 97,6 mg/100ml MES. Zawiesiny trawiono przez 11-14 h w tem. 25°C, a liście przez 14-16 h w tem. 24°C. Po zakończeniu trawienia protoplasty przesiewano przez sita o wielkości oczek 45 µm, a następnie przepłukiwano trzykrotnie w roztworze CPW9. Zastosowano trzy metody kultury protoplastów: płynną, zatapiania protoplastów w cienkiej warstwie agarozu oraz metodę kropli agarozowych tzw. „culture bead”. Pożywki agarozowe zestawiano za pomocą Sea Plaque Agarose (FMC Corp. Rockland, US). Do założenia kultury protoplastów zawieszonych użyto 3 rodzaje pożywek uzupełnione dwiema kombinacjami hormonów (Tab.1). W kulturze protoplastów mezofilu liścia zastosowano pożywki PCM3 i PCM5. Ustalono gęstość rozupelnienia w kulturze na poziomie 1x10⁵ (mezofilowe) i 2x10⁵ (zawieszinowe). Świeżą pożywkę ze zmniejszoną odpowiednio do 6%, 3% i 0% ilością mannitolu dodawano w tygodniowych lub dwutygodniowych odstępach czasu, w zależności od stopnia rozwoju kultury. Pojawiające się po około 6 tygodniach protokóły przenoszono na pożywki do regeneracji roślin (Tab.1). W regeneracji protokółów pochodzących z kultury zawiesiny hypokotylowej zastosowano pożywki RM1, RM2, RM3 i RM4. Na pożywkę RM4 przenoszono całe kropki podzielone na 4 fragmenty oraz protokóły zbliżone kształtem do zarodków. Protokóły i zarodki pochodzące z kultury zawiesiny liściennego układano na pożywkę RM4. Pożywki RMI-RM3 używano we wcześniejszych doświadczeniach do regeneracji zarodków somatycznych na eksplantatach liści *G. kurroo*. Pożywka RM4 została opracowana do regeneracji zarodków somatycznych z zawiesin komórkowych. Za pomocą odpowiednich barwników fluorescencyjnych oceniano żywotność protoplastów oraz odwarzanie ścian komórkowych w założonych kulturach.



Fot. 2. Protokóły (A) i zarodki (B) w kulturze kropli agarozowych, zarodki na pożywkę regeneracyjną (C), zregenerowana roślina (D)

Tab.1. Stosowane pożywki

RODZAJ	SKRÓT	SKŁAD POŻYWKI
płynna do namazania embriogenicznej tkanki (PEM)	CSM1	MS + 0,5mg/l 2,4-D + 1,0mg/l kinetyna
	CSM2	MS + 1,0mg/l dic + 2,0mg/l BAP + 0,1mg/l NAA + 80mg/l SA
	PCM1	MS + 0,5mg/l 2,4-D + 1,0mg/l kin
	PCM2	MS + 1,0mg/l dic + 2,0mg/l BAP + 80mg/l SA + 0,1mg/l NAA
do kultury protoplastów (do pożywek dodawano 3% glukozę i 9% mannitol)	PCM3	MS (-NH ₄ NO ₃) + 0,5mg/l 2,4-D + 1,0mg/l kin + 9g/l glutamina
	PCM4	MS (-NH ₄ NO ₃) + 1,0mg/l dic + 2,0mg/l BAP + 80mg/l SA + 0,1mg/l NAA + 9g/l glutamina
	PCM5	KM + 0,5mg/l 2,4-D + 1,0mg/l kin
	PCM6	KM + 1,0mg/l dic + 2,0mg/l BAP + 80mg/l SA + 0,1mg/l NAA
do regeneracji roślin	RM1	MS + 1mg/l NAA+0,5 CPPU
	RM2	MS + 1mg/l NAA + 2mg/l BAP
	RM3	MS + 1mg/l NAA+3mg/l TDZ
	RM4	MS + 80mg/l SA + 1mg/l kin+ 0,5mg/l GA ₃
do wzrostu roślin	1/2 MS	polowa makro- i mikroelementów; pełny skład witamin



Fot. 1. Zawieszina komórkowa (A), protoplasty bezpośrednio po izolacji (B), pierwszy podział komórkowy (C), kolejne podziały w kulturze agarozowej (D)

Tab.2. Kombinacje enzymów i wydajność izolacji protoplastów

RODZAJ ENZYMU	STĘŻENIA ENZYMÓW STOSOWANYCH W IZOLACJI PROTOPLASTÓW (mg/100ml)		
	WZAWIESIN KOMÓRKOWYCH		MEZOFILEU LIŚCI
	E1	E2	E3
Hemicelulase	2,5	5	-
Pectylase Y23	0,4	0,8	-
Driselase	0,5	1	-
Macerosyme R-10	1,5	3	0,2
Cellulase R-10	1,5	3	2
WYDAJNOŚĆ IZOLACJI			
frakcja	zawieszina pochodzenia hypokotylowego		2,2-6,1x10 ⁵
>500 µm	42,2-75x10 ⁵	35,2-58x10 ⁵	
500-300 µm	49-82x10 ⁵	40-62x10 ⁵	
300-150 µm	40-70x10 ⁵	45-67x10 ⁵	
	zawieszina pochodzenia liściennego		
>500 µm	28,5-67x10 ⁵	32,2-65x10 ⁵	
500-300 µm	37-72,1x10 ⁵	49-62x10 ⁵	
300-150 µm	32,2-70x10 ⁵	40-61,9x10 ⁵	

WYNIKI

Wydajność izolacji protoplastów (Fot.1B) zależała przede wszystkim od kondycji zawiesiny. W okresie wczesnowiosennym, obserwowano powstawanie dużej masy zarodków somatycznych bezpośrednio w kulturze wyjściowej. Miało to ujemny wpływ na plan protoplastów. Zastosowanie podwyższonego stężenia enzymów nie wpływało na zwiększenie wydajności izolacji. Żywotność protoplastów wahała się w granicach 94,2-96,7%. Protoplasty zawieszinowe w pożywkach agarozowych zaczynały odbudowywać ściany komórkowe po 24 godzinach, a po upływie kolejnej doby można było zaobserwować pierwsze, bardzo nieliczne, ich podziały (Fot.1C). W pożywkach płynnych ściany komórkowe nie były odbudowywane i nie obserwowano podziałów. Jedyną pożywką płynną, na której otrzymano protokóły z frakcji 150-300µm zawiesiny hypokotylowej, była PCM6 (PE=0,28%). Pierwsze kilkukomórkowe agregaty pojawiały się po 7-10 dniach (zawieszina liścienna) i 2-3 tygodniach (zawieszina hypokotylowa) (Fot.1D). Protokóły wielkości 0,5-1mm (Fot.2A) oraz zarodki (Fot.2B) powstawały, w kulturach prowadzonych na pożywkach agarozowych, po 5-6 tygodniach kultury. Na zarodkach bardzo często obserwowano wytwarzanie wtórnego kalusa. Najwyższą liczbę protokółów otrzymano w kulturze kropli agarozowych na pożywkę PCM6 (PE =5,85%). Na PCM1 nie otrzymano protokółów w żadnej z zastosowanych metod kultury. Na pozostałych pożywkach współczynnik podziałów wahał się: w kulturach kropli agarozowych od 0,3 do 5,85%, w kulturach protoplastów zatapianych w cienkiej warstwie agarozu od 0,014 do 1,32%. Po 3 kolejnych tygodniach protokóły lub zarodki przenoszono na pożywki regeneracyjne (Fot.2C). Dwa tygodnie później na protokółach obserwowano pojawianie się zarodków somatycznych, które najczęściej rozwijały się w wieloroślinki (Fot.2D). Regenerację roślin otrzymano na trzech z zastosowanych pożywek (RM2-RM4). Na pożywkę RM1 obserwowano jedynie zielonejąca kulis.

W kulturze protoplastów mezofilu liścia stwierdzono jedynie pierwszy podział komórkowy. Nie zdołano stworzyć odpowiednich warunków dla ich dalszych etapów wzrostu i rozwoju.

WNIOSKI

1. Kombinacja enzymów (E1) zapewniała uzyskanie żywotnych protoplastów izolowanych z zawiesin komórkowych.
2. Z zastosowanych trzech różnych systemów kultury protoplastów, tylko kultura kropli agarozowych stwarzała warunki do ich prawidłowego rozwoju
3. Najwyższą liczbę zielonych regenerantów uzyskano dzięki zastosowaniu następującej sekwencji pożywek: PCM6 → RM4 → 1/2MS