REGENERACJA ROŚLIN TYTONIU (*NICOTIANA TABACUM V.* SAMSUN) Z PROTOPLASTÓW PORAŻONYCH WIRUSEM MOZAIKI TYTONIU

Edward Pojnar, Tadeusz Kobyłko, Maria Lech

Akademia Rolnicza, Kraków

Wyizolowany protoplast jako jednostka funkcjonalna żywej materii składa się z cytoplazmy i jednego jądra komórkowego. Tylko protoplasty komórczaków zawierają wiele jąder. Odsłonięta plazmolemma protoplastów, znajdująca się w bezpośrednim kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym nadaje protoplastom specyficzne właściwości i stwarza duże możliwości ich zastosowania przy rozwiązywaniu różnych zagadnień badawczych.

Celem niniejszej pracy, w której wykorzystano protoplasty wyizolowane z liści tytoniu zakażonego wirusem mozaiki tytoniu (WMT) było wyhodowanie całych roślin i ustalenie udziału roślin zdrowych i zawirusowanych w otrzymanej tym sposobem populacji.

MATERIAŁ I METODA

Materiał wyjściowy do badań stanowiły rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* v. Samsun), zdrowe i zakażone wirusem mozaiki tytoniu (TMV vulgare strain). Protoplasty izolowano z liści tytoniu z objawami porażenia układowego stosując metodę Nagata i Takebe [5], zmodyfikowaną przez Powera i Cockinga [7]. Hodowlę wyizolowanych protoplastów prowadzono *in vitro*, w szalkach Petriego, w pożywce Nagata i Takebe [5] utwardzonej agarem. Agregaty kalusowe wyrosłe po upływie 4-6 tygodni przenoszono do szalek na zestaloną agarem pożywkę Murashiga i Skoga [4] udoskonaloną przez Sacristan i Melchersa [8]. Otrzymane pąki pędowe, w celu ukorzenienia, transplantowano na świeżą pożywkę Murashiga i Skooga. Ilość poszczególnych składników w tej pożywce zmniejszono do 1/3 i uzupełniono kwasem naftalenooctowym w ilości 0,1 mg/l. Ukorzenione pędy wysadzano do doniczek z ziemią.

WYNIKI I DYSKUSJA

W czasie realizacji postawionego na wstępie zadania napotkano na dość duże trudności i to zarówno przy otrzymywaniu protoplastów, jak i przy hodowli powstałych z protoplastów komórek, tkanek kalusowych czy też różnicujących się z nich organów. Stwierdzono, że żywotne protoplasty zakażone WMT bardzo szybko odbudowują ściany komórkowe i przechodzą wcześniej niż zdrowe, początkowe podziały komórkowe [6]. Po tym okresie aktywności następuje osłabienie tempa podziałów i dalsze etapy rozwojowe — agregaty komórkowe czy tkanki kalusowe — przechodzą już z dużym opóźnieniem w porównaniu z tymi, które wyhodowano z roślin zdrowych [3]. Z agregatów komórkowych, otrzymanych z roślin porażonych WMT, przeszczepionych na pożywkę Murashiga i Skooga, wkrótce po przeniesieniu znaczny procent ginie. Z pozostałych przy życiu — mimo dużych trudności — można jednak wyhodować całe rośliny, z tym że w końcowym etapie, w czasie przenoszenia do doniczek, rośliny najsilniej zdegenerowane i porażone WMT zasychają i obumierają.

W populacji roślin wyhodowanych z protoplastów wyizolowanych z liści zakażonych WMT liczebnie przeważają rośliny bardzo zdegenerowane, z wyraźnymi objawami układowego porażenia wirusem mozaiki tytoniu (rys. 1). Sporadycznie otrzymywano również rośliny bez objawów zewnętrznych wskazujących na zakażenie WMT. Spośród tych roślin jedne były zdrowe i w ich komórkach nie stwierdzano obecności cząsteczek wirusowych, pozostałe natomiast były zakażone WMT, mimo braku zewnętrznych objawów porażenia wirusowego. Chandra i Hildebrandt [1]

Rys. 1. Tytoń odmiany Samsun z objawami układowego porażenia WMT

otrzymali podobne wyniki hodując rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* Havana) z pojedynczych komórek zakażonych wirusem mozaiki tytoniu.

Fakt wyhodowania roślin zdrowych w podanych uprzednio warunkach sugeruje, że nie wszystkie komórki w liściach, z których izolowano protoplasty były opanowane przez wirus mozaiki tytoniu. Ze zdrowych protoplastów wyrastały więc zdrowe rośliny, mimo dużych możliwości zakażenia w czasie zachodzących podziałów komórek, tworzenia się tkanki kalusowej i różnicowania się organów przyszłych roślin. Do pożywki utwardzonej agarem dostają się bowiem ze zniszczonych protoplastów znaczne ilości cząsteczek wirusa.

Esau i Gill [2] opierając się na badaniach własnych oraz Chandra i Hildebrandta [1] tłumaczą możliwość uzyskania zdrowej rośliny również z komórki zawirusowanej. W czasie podziału zakażonej komórki albo następuje rozdzielenie cząsteczek wirusa pomiędzy dwie komórki siostrzane, albo wirus pozostaje tylko w jednej komórce. W tej drugiej sytuacji z komórki wolnej od wirusa wyrasta zdrowa roślina.

Wytłumaczenie dlaczego spośród otrzymanych z protoplastów roślin zawierających w komórkach cząsteczki WMT, jedne są silnie zdegenerowane i opóźnione w rozwoju, a drugie nie wykazują objawów chorobowych, wymaga dalszych doświadczeń. Być może pierwsze z nich wywodzą się z protoplastów, które zostały opanowane przez wirus mozaiki tytoniu jeszcze wtedy, gdy znajdowały się w komórkach liścia, a drugie uległy zakażeniu po wyizolowaniu, w trakcie hodowli *in vitro*.

LITERATURA

1. Chandra N., Hildebrandt A. C.: Differentiation of plants from tobacco mosaic virus inclusion- bearing and inclusion-free single tobacco cells. Virology 1967, t. 31, s. 414-421
2. Esau K., Gill R. H.: Tobacco mosaic virus in dividing mesophyll cells of *Nicotiana*. Virology 1969, t. 38, s. 464-472
3. Kobyłko T., Pojnar E., Przyłuska M.: Wzrost i różnicowanie się komórek zregenerowanych z protoplastów wyizolowanych z liści tytoniu zakażonych WMT. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1976, z. 182, s. 9-15
4. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962, t. 15, s. 473-497
5. Nagata T., Takebe I.: Plating of isolated tobacco mesophyll protoplast on agar medium. Planta 1971, t. 99, s. 12-20
6. Pojnar E., Kobyłko T., Przyłuska M.: Żywotność protoplastów wyizolowanych z liści tytoniu (*Nicotiana tabacum* v. Samsun), zakażonych wirusem mozaiki tytoniu. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 1976, z. 174, s. 11-16
7. Power J. B., Cocking E. C.: Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. J. exp. Bot. 1970, t. 21, s. 64-70

8. Sacristan M. D., Melchers G.: The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. Molec. gen. Genetic. 1969, t. 105, s. 317-333

Эдвард Пойнар, Тадеуш Кобылко, Мария Лех

РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ ТАБАКА *(NICOTIANA TABACUM* V. SAMSUN) ИЗ ПРОТОПЛАСТОВ ПОРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ МОЗАИКИ ТАБАКА

Резюме

Из культур протопластов изолированных из зараженных ВМТ листьев табака (*Nicotiana tabacum* v. Samsun) выращено целые растения. В полученной популяции численно преобладали сильно выродившиеся растения, с отчетливыми признаками поражения вирусом мозаики табака. Из остальных нормально развитых растений одни были заражены, другие в клетках не содержали частичек ВМТ.

Edward Pojnar, Tadeusz Kobyłko, Maria Lech

REGENERATION OF TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* V. SAMSUN) PLANTS FROM PROTOPLASTS INFECTED WITH TMV

Summary

From cultures of protoplasts isolated from TMV-infected tobacco leaves, complete plants were cultivated. The resulting population exhibited a quantitative predominance of greatly degenerated plants, with distinct symptoms of TMV infection. As concerns the remaining normally developed plants, some were infected, whereas other ones contained no TMV particles in the cells.

Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 28 02 76