

WZROST I RÓŻNICOWANIE SIĘ KOMÓREK ZREGENEROWANYCH Z PROTOPLASTÓW WYIZOLOWANYCH Z LIŚCI TYTONIU, ZAKAŻONYCH WMT

Tadeusz Kobyłko, Edward Pojnar, Maria Przyłuska

Instytut Przyrodniczych Podstaw Produkcji Roślinnej AR, Kraków

Rośliny wyhodowane z wyizolowanych protoplastów są płodne, ale często u otrzymanych tą drogą roślin jest zmieniony wygląd zewnętrzny i zachodzą różnice w liczbie chromosomów [8]. Czynnikiem mutagennym w kulturach protoplastów są przypuszczalnie warunki termiczne, w jakich przebiega ich hodowla. Napromienianie i fuzja somatyczna protoplastów wpłynąć mogą jeszcze w większym stopniu na zmiany morfologiczne roślin otrzymywanych z wyizolowanych protoplastów.

Na wyizolowanych protoplastach prześlędzono etapy zakażenia wirusowego i namnażania się wirusa w komórce roślinnej. Badania te przyczyniły się do dalszego wyjaśnienia mechanizmu zakażenia wirusowego u roślin [1, 4]. Istnieją również możliwości wyhodowania z zakażonych, wyizolowanych protoplastów całych roślin. Jak wynika z naszych wcześniejszych badań [5], protoplasty wyizolowane z zakażonych wirusem mozaiki tytoniu roślin odmiany Samsun, są mniejsze od protoplastów otrzymanych z roślin zdrowych, a chloroplasty w nich zawarte są żółto-zielone. Wolne protoplasty z roślin chorych są żywotne i wykazują zdolność do odbudowy ściany komórkowej. Zregenerowane z tych protoplastów komórki dzielą się i formują kalus wielokomórkowy [5].

Doświadczenie przeprowadzono w celu ustalenia liczebności przeżywających protoplastów, ich tempa wzrostu, intensywności podziałów komórek zregenerowanych z protoplastów, stopnia opanowania ich przez wirus mozaiki tytoniu oraz wykazania w jakim stopniu kalus, otrzymany z zakażonych WMT roślin jest zdolny do różnicowania organów (pędów i korzeni).

MATERIAŁ I METODYKA

Z roślin tytoniu (*Nicotiana tabacum* v. Samsun), zakażonych wirusem mozaiki tytoniu i zdrowych, izolowano protoplasty według zmodyfikowanej metody Powera i Cockinga [6]. Wyizolowane i oczyszczone protoplasty przenoszono do pożywki Nagata i Takebe [3] o pH 5,8, do której przed wysianiem protoplastów dodawano 1,2% agaru. Kultury protoplastów zatopiono w pożywce z agarem w szalkach Petriego i hodowano w oświetlonym bocznie termostacie, przy natężeniu światła 2000 luksów i w temperaturze 28°C.

Wyrosłe po czterech tygodniach kalusy, o średnicy około 0,5 mm, przenoszono na zmodyfikowaną przez Sacristan i Melchersa [7] pożywkę Murashiga i Skooga [2], oznaczoną przez autorów symbolem B₃. Na tej pożywce po czterech dalszych tygodniach lub dłuższym nieco okresie (gdy kalus jest zakażony WMT), z kalusa wyrastały małe, zielone, nieukorzenione pędy, które ukorzeniały się po przeniesieniu na nową pożywkę Murashiga i Skooga [7], ze zmniejszoną do 1/3 ilością poszczególnych składników i z dodatkiem 0,1 mg/l kwasu naftaleno-octowego. Po ukorzenieniu małe roślinki przenoszono do doniczek z ziemią.

WYNIKI

Wyizolowane z roślin zakażonych WMT protoplasty są początkowo mniejsze od protoplastów z roślin zdrowych. W późniejszym okresie różnice wyrównują się, bowiem wzrost protoplastów wyizolowanych z roślin

Tabela 1

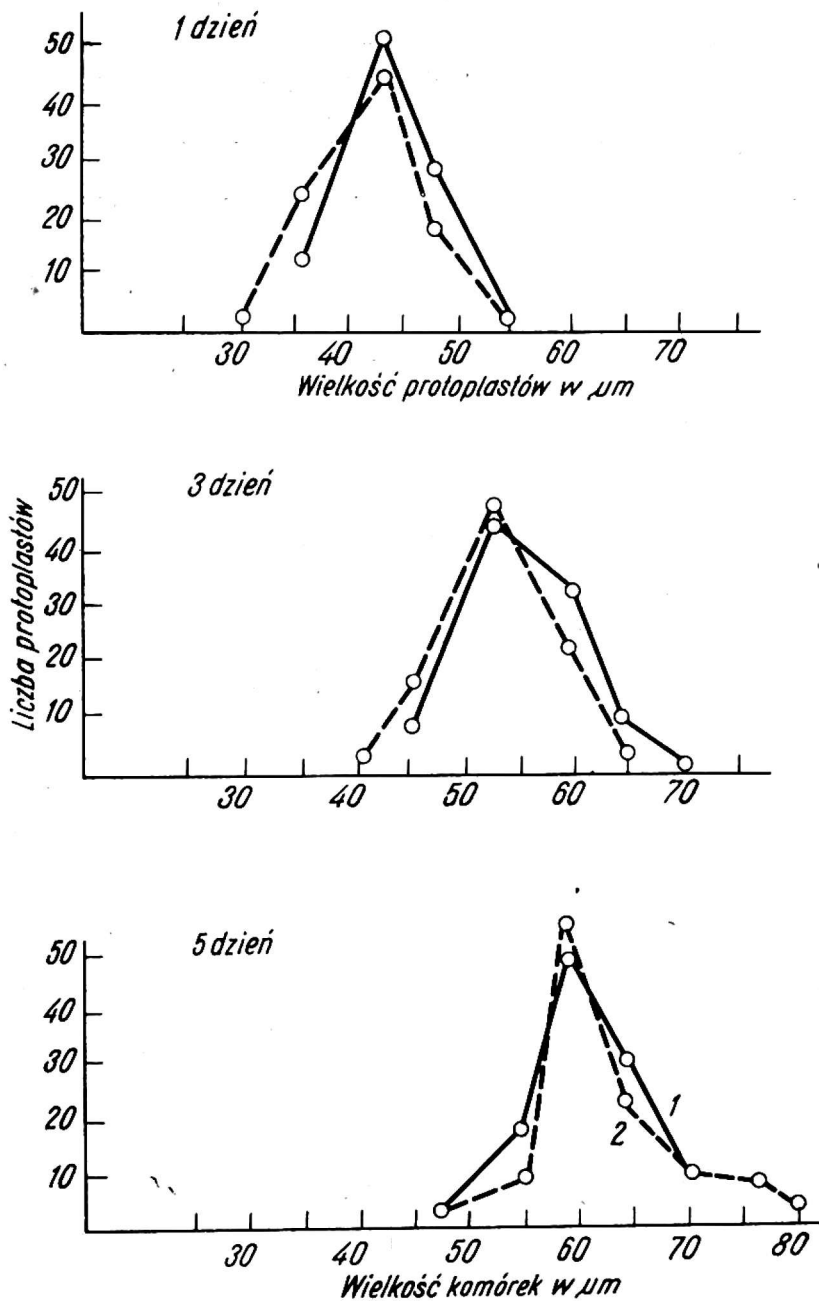
Tempo wzrostu protoplastów wyizolowanych z liści tytoniu v. Samsun zdrowych i zakażonych WMT

Liczba dni po wyizolowaniu	Średnie wielkości protoplastów z liści (w μm)	
	zdrowych	zakażonych WMT
1	41,0	35,1
2	48,1	46,6
3	55,1	53,3
4	60,2	60,3
5	61,1	61,5
Przyrost od 1 do 5 dnia	20,1	25,4

Przedział ufności ($P = 0,05$) — 2,42.

zakażonych jest szybszy. Średni przyrost w ciągu pięciu początkowych dni dla protoplastów zdrowych wynosi około 20,1 μm , a dla protoplastów zakażonych wirusem mozaiki tytoniu 25,4 μm (tab. 1).

Po czterech lub pięciu dniach średnie wielkości komórek zregenerowanych z protoplastów wyizolowanych zarówno z liści tytoniu zdrowych, jak i zakażonych WMT wynosiły około $61 \mu\text{m}$ (tab. 1). W tym czasie zauważono również zmiany w wielkości protoplastów i komórek, powstałych z tych protoplastów. Wśród zakażonych wirusem mozaiki tytoniu komórek, obserwowano często komórki „giganty”, których średnice wahały się w granicach $70\text{--}80 \mu\text{m}$ (rys. 1). Komórki te nie wykazywały jednak



Rys. 1. Liczba i wielkość protoplastów i komórek w początkowym etapie rozwoju
1 — zdrowe, 2 — zakażone WMT

tendencji do podziału i miały czasem kształt wydłużony lub rogalikowaty. Komórki giganty po pewnym czasie zamierały. W kulturach komórkowych zregenerowanych z protoplastów zdrowych, komórki giganty należały do rzadkości.

W czwartym lub piątym dniu od momentu wyizolowania, powstałe z protoplastów komórki przechodziły stadia przygotowawcze do podziałów.

Komórki zakażone wirusem mozaiki tytoniu nieco wcześniej rozpocząły podziały niż komórki zregenerowane ze zdrowych protoplastów. Zwykle przy pierwszych podziałach komórek zakażonych WMT, komórki zdrowe znajdowały się w stadium przygotowawczym do podziałów (tab. 2).

Tabela 2

Intensywność podziałów komórkowych zregenerowanych z protoplastów wyizolowanych z liści tytoniu v. Samsun

Protoplasty z roślin	Procent dzielących się komórek w kolejnych dniach hodowli protoplastów					
	5	6	7	8	9	10
Zdrowych	gotowość do podziałów	38,6	59,9	81,5	97,6	98,0
Zakażonych WMT	nieliczne podziały	31,1	51,4	57,6	62,8	63,0

W szóstym i następnych dniach liczba dzielących się komórek zdrowych znacznie wzrosła. Po upływie dziesięciu dni prawie wszystkie zdrowe komórki (98⁰%) kilkakrotnie dzieliły się, natomiast komórki zregenerowane z protoplastów zawirusowanych, dzieliły się znacznie słabiej (63⁰%). Reszta komórek ginęła, podobnie jak i komórki giganty.

Kalusy z protoplastów otrzymanych z liści zdrowych i zakażonych wirusem tytoniu, przeniesione na pożywkę Murashiga i Skooga [2], zmodyfikowaną przez Sacristàn i Melchersa [7], przechodziły morfogenezę, wytwarzając pąki pędowe. W kalusie zakażonym WMT formowanie pąków pędowych zachodziło znacznie wolniej. Badania zawartości wirusa w pąkach pędowych i kalusie zakażonym WMT wykazały znaczne ilości cząsteczek wirusowych zarówno w kalusie, jak i w wyrastających z niego pąkach pędowych. Przeniesienie kalusa z jednej pożywki na drugą nie eliminuje całkowicie cząsteczek wirusa z otoczenia kalusa, które mogą być również źródłem zakażenia dla zdrowych jeszcze komórek.

W pąkach pędowych uwodnionych, testowanych na połówkach liści tytoniu odmiany Xanthi, było nieco więcej cząsteczek wirusa w komórkach, w porównaniu z kalusem uwodnionym. Rozbieżności te malały jeśli doświadczenie prowadzono z powietrznie suchymi pąkami pędowymi i kalusem. Widocznie ilości wirusa w komórkach pąków pędowych i w kalusie są zbliżone, a różnice były uwarunkowane znacznym uwodnieniem kalusa (tab. 3).

Następny pasaż na $\frac{1}{3}$ pożywki Murashiga i Skooga [2], z dodatkiem 0,1 mg/l kwasu naftaleno-octowego prowadził do ukorzenia pąków pędowych. Wyhodowane w ten sposób z protoplastów wyizolowanych z liści roślin zakażonych WMT, małe roślinki, trudno jest utrzymać przy życiu

Tabela 3

Zawartość WMT w komórkach kalusa i pąkach pędowych w pierwszych etapach morfogenezy, (oznaczona testem biologicznym na połówkach liści *Nicotiana tabacum* v. *Xanthi*)

Materiał roślinny ^a	Liczba plamek			
	I etap (początek różnicowania pędu)		II etap (stadium uformowanego pędu)	
A Pąki pędowe (uwodnione)	80	A/B	95	A/B
B Kalus (uwodniony)	61	1,3/1	23	4,1/1
C Pąki pędowe (powietrznie suche)	69	C/D	68	C/D
D Kalus (powietrznie suchy)	54	1,2/1	34	2,0/1

^a 10 pąków pędowych i odpowiednia ilość gramów świeżej i powietrznie suchej masy kalusa.

w warunkach szklarniowych. Roślinki te są często silnie zdegenerowane i cechują się bardzo wolnym rozwojem w porównaniu z roślinami, które otrzymano z protoplastów wyizolowanych z liści roślin zdrowych.

DYSKUSJA

Początkowy rozwój protoplastów wyizolowanych z zakażonych WMT liści tytoniu przebiegał dość dynamicznie. Obserwowano znaczną stymulację wzrostu zakażonych WMT protoplastów i komórek z nich powstałych oraz przyspieszenie pierwszych podziałów komórkowych. Protoplasty zatopione w pożywce zestalonej agarom znajdują bowiem doskonale warunki do wzrostu, regeneracji ścianki komórkowej i dalszego rozwoju.

Dla wirusów znajdujących się w pojedynczych, odosobnionych protoplastach, a później po zregenerowaniu ściany komórkowej w komórkach oderwanych od całości organizmu roślinnego, środowisko to przypuszczalnie nie sprzyjało ich namnażaniu. Wirus przechodził (prawdopodobnie) na krótki okres jakby w stan utajony. Możliwe, że i podłoże w jakim znajdują się protoplasty czy komórki, a więc pożywka, w skład której wchodzi nieorganiczne związki i niektóre substancje wzrostowe, wpływa hamująco na namnażanie się cząsteczek wirusa. Dlatego też do chwili pierwszych podziałów wirus mozaiki tytoniu nie daje o sobie znać i stąd obserwuje się w tym okresie intensywny wzrost i rozwój protoplastów i komórek powstałych z protoplastów po zregenerowaniu ściany komórkowej. Później, kiedy po podziałach tworzy się kalus kilkukomórkowy, intensywne namnażanie się wirusa zwalnia tempo podziałów komórko-

wych. W dalszym etapie, gdy kalusy zdrowe zaczynają różnicować pąki pędowe, kalusy zakażone wirusem mozaiki tytoniu, uformowane z nielicznych komórek, są dopiero w początkowym stadium rozwoju. Zwolnione obecnością wirusa tempo podziałów komórkowych, opóźnione wytwarzanie pąków pędowych, pociąga za sobą trudności w ukorzenianiu się tych przyhamowanych w rozwoju pąków. Z małych roślin, słabo ukorzenionych, przeniesionych do doniczek z ziemią, wśród których nieliczne wykazują czasem znaczny stopień degeneracji, tylko mały procent może kontynuować dalszy wzrost i rozwój.

LITERATURA

1. Cocking E. C., Pojnar E.: An electron microscopic study of the infection of isolated fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *J. gen. Virol.*, 1969, t. 4, s. 305-312
2. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 1962, t. 15, s. 473-497
3. Nagata T., Takebe J.: Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta (Berl.)*, 1971, z. 99, s. 12-22
4. Pojnar E.: Badania nad protoplastami wyizolowanymi z owoców pomidora. *Zesz. nauk. WSR Kraków*, 1969, t. 16, s. 1-48
5. Pojnar E., Kobylko T., Przyłuska M.: Żywotność protoplastów wyizolowanych z ilości tytoniu (*Nicotiana tabacum* v. Samsun), zakażonych wirusem mozaiki tytoniu. *Zesz. Probl. Post. Nauk rol.* 1975, z. 174
6. Power J. B., Cocking E. C.: A simple method for the isolation a very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Biochem. J.*, 1968, z. 111, s. 338
7. Sacristan M. D., Melchers G.: The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. *Molec. gen. Genetics*, 1969, z. 105, s. 317-333
8. Takebe J., Labib G., Melchers G.: Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 1971, z. 58, s. 318-320

Тадеуш Кобылко, Эдвард Пойнар, Мария Прилука

РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КЛЕТОК РЕГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ ПРОТОПЛАСТОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ТАБАКА, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ МОЗАИКИ ТАБАКА

Резюме

Из протопластов изолированных из листьев табака сорта Samsun, зараженных вирусом мозаики табака, выращены небольшие растения. Исследовано темп роста и развития протопластов зараженных вирусом, а также интенсивность делений клеток регенерированных из протопластов клеток. Установлено, что только в начальном периоде присутствие вируса в изолированных прото-

пластах, а затем в образовавшихся из них клетках — не оказывают большего влияния на их рост и развитие. Позже же присутствие вируса в клетках тормозит дальнейшее деление клеток, образование каллюса и почечек, а также корней. Некоторые малые растения полученные из протопластов изолированных из зараженных ВМТ листьев табака, сильно выродившиеся и только незначительный процент этих растений способен к дальнейшему росту и развитию.

Tadeusz Kobyłko, Edward Pojnar, Maria Przyłuska

GROWTH AND DIVISION OF THE CELLS REGENERATED FROM THE ISOLATED TOBACCO LEAF PROTOPLASTS INFECTED BY TOBACCO MOSAIC VIRUS

Summary

From the isolated tobacco leaf protoplasts (Samsun variety), infected by tobacco mosaic virus, small plants have been cultivated. Growth rate and development of the protoplasts infected by virus as well as intensity of division of the cells regenerated from protoplasts were investigated. It was found that only in the initial stage the presence of virus in the isolated protoplasts and subsequently in the cells originated from them, did not exert any marked effect on their growth and development. In a later stage, however, its presence was found to inhibit further cell division and formation of callus, shoots and roots. Some smaller plants obtained from the isolated tobacco leaf protoplasts infected by TMV were strongly degenerated and only a small percent was capable of further growth and development.