

Zastosowanie odmian *Raphanus sativus* do oznaczania aktywności cytokinin testem biologicznym

DOROTA KUBOWICZ i EWA GRODZKA

Katedra Botaniki Leśnej, Wydział Leśny, SGGW — AR, ul. Rakowiecka 26/30,
02-528 Warszawa

(Otrzymano dn. 1985.12.10)

D. Kubowicz, E. Grodzka (*Forest Botany Department, Warsaw Agricultural University, 26/30 Rakowiecka, 02-528 Warsaw, Poland*) *Acta Agrobotanica* 40 (1—2: 21-25, 1987.

*The use of cultivars of *Raphanus sativus* for cytokinin bioassay*

Abstract

Six cultivars of radish (*Raphanus sativus*) were tested for their usefulness in radish cytokinin bioassay by the method of Letham (1971). The best cultivar was found to be 'Sopel Lodu' which responds well to both zeatin and 2iP over a wide range of concentrations. The fresh weight of cotyledons increased at most by 71.5% (if treated with zeatin) or 101.0% (if treated with 2iP) compared to untreated cotyledons. This cultivar is also sensitive to the partially purified cytokinin-like fraction isolated from the pine (*Pinus silvestris*) cambial region. The cultivar 'Sopel Lodu' is therefore proposed to be a suitable plant for cytokinin bioassays.

WSTĘP

Test liścieni rzodkiewki (*Raphanus sativus*), zaproponowany przez Lethama (1968), oparty jest na zdolności fitohormonów z klasy cytokinin do stymulacji wzrostu liścieni rzodkiewki. Cytokiny stymulują podziały komórek liścieni, a zwłaszcza powiększanie ich rozmiarów (Gordon i Letham, 1975; Tsui i in., 1980), co związane jest głównie z większym pobieraniem wody (Gordon i Letham, 1975) w efekcie zwiększonego stężenia związków osmotycznie czynnych (Tsui i in., 1980) oraz wzrostu plastyczności ścian komórkowych (Longo i in., 1978).

Użyta przez Lethama (1968, 1971) odmiana 'Long Scarlet' charakteryzuje się przyspieszonym wzrostem komórek liścieni w obecności ki-

netyny i zeatyny, w zakresie stężeń od 0.002 do 10 mM. Pewne zalety testu rzodkiewkowego (jak na przykład krótki czas hodowli liścieni) zdecydowały o rozpoczęciu prób zastosowania w bioteście szeregu dostępnych w Polsce odmian rzodkiewek.

MATERIAŁ I METODY

Użyto sześć odmian rzodkiewki: 'Inspektowa Saxa', 'Sopel Lodu', 'Tetra Hłowiecka', 'Cherry Belle', 'Szkarłatna z Białym Końcem' i 'Würsburska'. Testy przeprowadzono według metody Lethama (1971). Nasiona umieszczano na wilgotnej bibule filtracyjnej, na okres 48 godzin. Następnie izolowano z zarodków po jednym ("wewnętrznym") liścieniu, które umieszczano w płytkach Petriego o średnicy 10 cm, na krążkach bibuły filtracyjnej, nasyconych 3 ml roztworu 4 mM fosforanu potasu oraz dodatkowo roztworem zeatyny, 6-(γ,γ -2-metyloallilo)aminopuryny (2iP) lub ekstraktu roślinnego w różnych stężeniach. Płytki ustawiano w plastikowych przezroczystych pudełkach, w oświetleniu około 700 lux. Po 3 dniach liścienie osuszano i ważono.

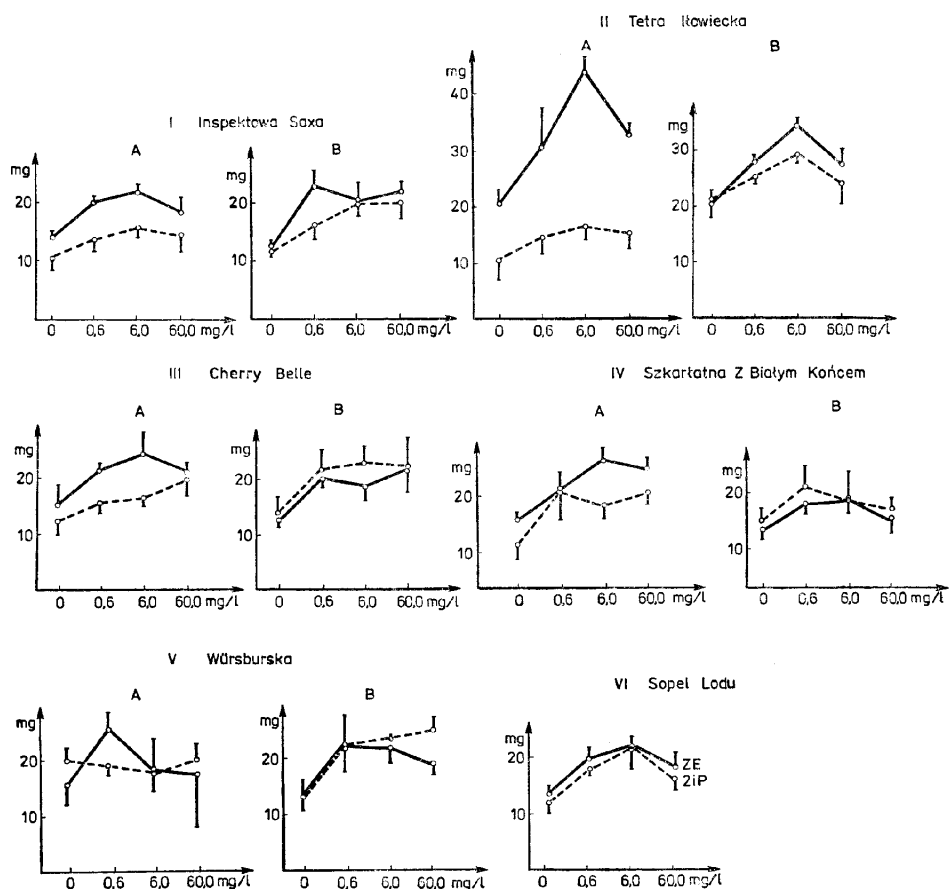
Cytokiny zastosowano w następujących stężeniach: 0,6, 6,0 i 60,0 mg/l (liścienie odmiany 'Sopel Lodu' dodatkowo testowano w zakresie stężeń od 0,03 do 100,0 mg/l). Każde ze stężeń cytokinin testowano w 4 powtórzeniach, umieszczając po 12 liścieni w każdej płytce. Doświadczenia przeprowadzano dwukrotnie.

Ponadto część liścieni inkubowano w roztworze zawierającym oczyszczony ekstrakt z tkanki regionu kambialnego z pnia 76-letnich sosn (*Pinus silvestris*), zebranej w marcu i czerwcu. Ekstrakcję i oczyszczanie ekstraktu przeprowadzono według metody opracowanej przez Kubowicz (1979).

Ekstrakt rozdzielano z octanem etylu, chromatografowano na kolumnie Dowex 50W-X8 i rozdzielano chromatografią bibułą. Do testu użyto (1) eluaty z odcinków chromatogramów o R_F 0,2-0,8, stosując ekwiwalent 0,3, 1,0, 3,0 i 10,0 g świeżej tkanki/ml (tkanka zebrana w czerwcu) i (2) eluaty z odcinków chromatogramów o R_F 0,05-0,2, 0,2-0,4 i 0,4-0,8 (tkanka zebrana w marcu). Frakcje rozdzielano dodatkowo za pomocą TLC w solwencie chloroform : aceton : metanol (1 : 1 : 1 v/v/v); do testu przeznaczono eluaty z odcinków chromatogramów płytkowych o R_F 0,1-0,9. Frakcje stosowano w ekwiwalentach 0,5 i 5,0 g świeżej tkanki/ml. Przy testowaniu oczyszczonych ekstraktów tkanki zastosowano tylko odmianę 'Sopel Lodu'.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zależność między świeżą masą 5-dniowych liścieni badanych odmian a stężeniem zeatyny lub 2iP przedstawiono na rysunku 1 (I-VI). Najniższe optimum wzrostu liścieni — przy stężeniu 6 mg/l — wykazała odmiana 'Szkarłatna z Białym Końcem' (inkubacja z 2iP). W przypadku odmiany 'Würsburska' nie stwierdzono stymulacji wzrostu liścieni wraz ze zwiększaniem stężeń cytokinin (podobne wyniki uzyskano we wstępnych doświadczeniach z rybozydem zeatyny — dane nie publikowane). Dla pozostałych 4 odmian optymalnym stężeniem było 6,0 mg/l. W większości przypadków powtarzalność doświadczeń była niska. Wysoką wraz-

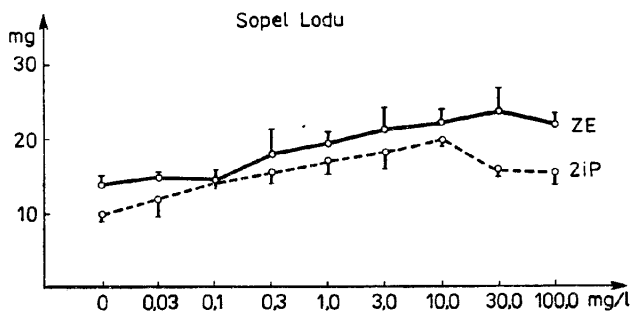


Rys. 1. Wpływ stężenia zeatyny (A) i 2iP (B) na świeżą masę izolowanych liścieni 6 odmian rzodkiewki. Linie: ciągła i przerywana obrazują wyniki 2 doświadczeń (z wyjątkiem odmiany 'Sopel Łodu')

Fig. 1. The effect of various zeatin (A) and 2iP (B) concentrations on the fresh weight of isolated cotyledons of six radish cultivars. Solid lines and dashed lines show the results of two experiments (except cv. 'Sopel Łodu')

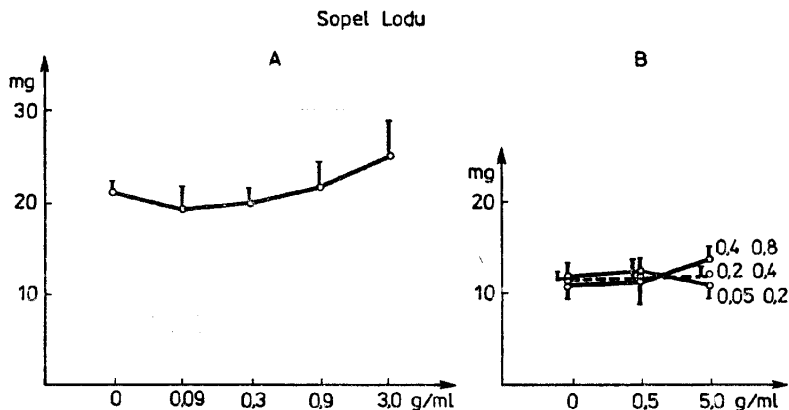
liwość, zarówno przy stosowaniu stężenia 6,0 mg/l, jak i niższego, wykazała odmiana 'Sopel Lodu' w stosunku do obydwu badanych cytokinin. Test z jej zastosowaniem również charakteryzował się powtarzalnością wyników. Odmianę tę proponujemy do stosowania w metodach oznaczania aktywności cytokininowej w zakresie niższych stężeń tych fitohormonów.

Krzywa wzrostu odmiany 'Sopel Lodu', wyznaczona dla 9 różnych stężeń zeatyny i 2iP (rys. 2) obrazuje dokładniej zakres wrażliwości tej odmiany. Optimum wzrostu przypada przy stężeniu od 10 mg/l (dla 2iP — przyrost masy liści o 101%) do 30 mg/l (dla zeatyny — przyrost masy liści o 71,5%). Reakcję wzrostową na zastosowaną cytokininę stwierdzono już przy najniższym z badanych stężeń — 0.03 mg/l.



Rys. 2. Zależność masy liści rzdżewki odmiany 'Sopel Lodu' od stężenia zeatyny (ZE) i 2iP

Fig. 2. The effect of different zeatin (ZE) and 2iP concentrations on the weight of radish cotyledons, cv. 'Sopel Lodu'



Rys. 3. Wpływ stężenia ekstraktu z tkanki kambialnej sosny na świeżą masę liści rzdżewki odmiany 'Sopel Lodu'. A — ekstrakt niefrakcjonowany, B — ekstrakt frakcjonowany na trzy frakcje

Fig. 3. The effect of different concentrations of pine cambial extract on radish (cv. 'Sopel Lodu') cotyledon fresh weight. A — non-fractionated extract, B — extract fractionated into three fractions

Oczyszczony ekstrakt stymulował wzrost liścieni (rys. 3). Dotyczy to zarówno wstępnie oczyszczonego ekstraktu (rys. 3A), jak i frakcji o R_F 0,4-0,8, pochodzącej z ekstraktu poddanego dalszej chromatografii (rys. 3B).

Odmiana rzodkiewki 'Sopel Lodu' może być stosowana do oznaczeń aktywności cytokininowej oczyszczonych ekstraktów roślinnych.

W pracy zostały wykorzystane wyniki doświadczeń wykonanych w ramach Koła Naukowego Biologów Instytutu Biologii Roślin SGGW-AR w Warszawie.

LITERATURA

- Gordon M. E., Letham D. S., 1975. Regulators of cell division in plant tissues. XXII. Physiological aspects of cytokinin-induced radish cotyledon growth. Aust J. Plant Physiol. 2: 129-154.
- Kubowicz D., 1979. The possible relation between cytokinins and secondary xylem formation in *Pinus silvestris*. I. Seasonal correlations. Acta Soc. Bot. Pol. 48: 295-303.
- Letham D. S., 1968. A new cytokinin bioassay and the naturally occurring cytokinin complex. [W:] Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances, Runge Press. Ottawa ss. 19-31.
- Letham D. S., 1971. Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. Physiol. Plant. 25: 391-396.
- Longo G. P., Longo C. P., Rossi G., Tale A., Pedretti M., 1978. Variations in carbohydrate and in osmotic potential of watermelon cotyledons treated with benzyladenine. Plant. Sci. Letters 12: 199-207.
- Tsui C., Guo-qing T., Hui-ying Ch., Yan-ru S., Han-ping L., Zhe T., Shu-huan L., Xian-zhang L., 1980. Effect of cytokinins on the expansions and metabolism of excised cucumber cotyledons. Aust. J. Plant Physiol. 7: 227-236.

STRESZCZENIE

Zbadano przydatność sześciu odmian rzodkiewki (*Raphanus sativus*) do biotestu na cytokininy, opracowanego przez Lethama (1971). Stwierdzono wysoką przydatność odmiany 'Sopel Lodu', która charakteryzowała się wrażliwością na zeatynę i 2iP w szerokim zakresie stężeń. Jednocześnie wysoka była wrażliwość tej odmiany — w stężeniach optymalnych cytokininy stymulowały przyrost masy liścieni o 71,5% (w przypadku zeatyny) lub 101% (w przypadku 2iP). Stwierdzono również reakcję wzrostową liścieni odmiany 'Sopel Lodu' na częściowo oczyszczoną frakcję cytokininową, otrzymaną z tkanek regionu kambialnego pnia sosny, metodą Kubowicz (1979). Odmianę rzodkiewki 'Sopel Lodu' można więc polecić do oznaczeń aktywności cytokininowej metodą testu biologicznego.