Wpływ produktów pszczelich na wzrost tkanek roślinnych in vitro

I. Wpływ miodu i wyciągu pyłkowego na wzrost tkanek tumora bakteryjnego *Nicotiana tabacum* i *Crotolaria spectabilis*

Effect of bee products on the growth of plant tissues in vitro. I.

A. RENNERT i M. GUBANSKI

WSTĘP

Wprowadzenie techniki kultur tkankowych do badań botanicznych otwiera nowe możliwości interpretacji licznych zjawisk wynikających z zależności organizmu od środowiska. Tkanki hodowane in vitro stanowią odizolowane układy, łatwo reagujące w określony sposób na stwarzane przez eksperymentatora warunki zewnętrzne. Ścisłe kontrolowane warunki hodowli oraz jednorodność tkanek predysponuje je do wyjaśniania problemów o charakterze fizjologicznym, biochemicznym, patologicznym itp. Nieocenione zasługi w tej dziedzinie położyli: White 1939, Gautheret 1939, Klein 1957, Hildebrandt 1946, Braun 1959, Czosnowski 1952 oraz wielu innych. Twórczy rozwój tej techniki umożliwia obecnie hodowlę pojedynczych komórek roślin wyższych, które zdaniem Nickella i Tuleckke'a (1960) reprezentują nową klasę mikroorganizmów. Są to bowiem „komórki roślinne uwolnione od kontroli rośliny macierzystej — poddane kierowaniu i wnikliwości badacza”. Takie ujęcie zagadnienia stwarza nieograniczone możliwości o aspekcie praktycznym.

Jednym z trudniejszych problemów przy hodowli tkanek roślinnych in vitro jest dobór odpowiedniej pożywki, możliwie prostej i uniwersalnej. Tkanki wielu roślin wyższych dają się hodować na stosunkowo prostych podłożach syntetycznych. W większości wypadków jednak uzupełnia się je dodatkowymi składnikami zapewniającymi wzrost optymalny. Rolę tę spełniają stosowane od dawna wyciągi drożdżowe, wyciągi z tkanek niektórych roślin, hydrolizaty kazeinowe i inne (Hildebrandt i wsp. 1946). Znaczenie tych składników jest jednak ogra-

niczone. Najuniwersalniejszym dodatkiem tego typu okazało się mleko kokosowe, stosowane ostatnio przez wielu amerykańskich badaczy (Caplin i wsp. 1948). Biorąc jednak pod uwagę wysoką cenę preparatu, jak również to, że jest on w wielu laboratoriach niedostępny, możliwość wykorzystania mleka kokosowego do hodowli na szerszą skalę jest bardzo ograniczona. Z tego względu wydaje się, że znalezienie tańszego i łatwiej dostępnego środka może mieć duże znaczenie.

W badaniach naszych zwróciliśmy uwagę na produkty pszczele, a mianowicie miód, pyłek i mleczko. Wydawało się bowiem, że produkty te winny zawierać uzupełniające elementy, niezbędne dla wzrostu tkanek roślinnych. Nasze doświadczenia w dużej mierze przemawiają za słuszością tego przypuszczenia.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na tkankach tumora bakteryjnego tytoniu (*M. tabacum* v. White Burley) oraz *Crotolaria spectabilis* wyizolowanych w naszej pracowni, systematycznie przeszczepianych w 1-miesięcznych odstępach czasu. Pożywka zasadnicza dla tkanki tytoniu miała następujący skład:

	mg		mg
Ca(NO ₃) ₂ bezw.	— 200	KJ	— 0,75
Na ₂ SO ₄	— 200	KBr	— 0,75
KNO ₃	— 80	glikokol	— 3
KCl	— 65	cysteina HCl	— 10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	— 40	kwas nikotynowy	— 0,5
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	— 20	pirydoksyna	— 0,5
Fe ₂ (SO ₄) ₃	— 2,5	tiamina	— 1
MnSO ₄	— 5	inozytol	— 500
CuSO ₄ · 5H ₂ O	— 2	biotyna	— 0,1
ZnSO ₄	— 1,5	glikoza 2%, agar 0,7%	
H ₃ BO ₃	— 1,5		

Składniki pożywki zaczerpnięto z modyfikacji White'a (cyt. Pontowicz 1959), dodatki: cysteina HCl uzupełniono wg Czosnowskiego (1952), inozytol i biotynę wg Hildebrandta (Hildebrandt i wsp. 1946) dla tkanek tytoniu. Tkanę *Crotolaria spectabilis* hodowano na 4× stężonej pożywce mineralnej White'a z dodatkiem ekstraktu drożdżowego jak podaje Ruge (1955). Probówki z pożywką sterylizowano w autoklawie przez 15 minut w temp. 120°C. W badaniach stosowano miód kwiatowy o barwie żółcistożółtej, pochodzący z prywatnej pasieki (F. Jamróży, Kołaczkowice, pow. Rawicz), ze zbiorów lipcowych 1961 r. Pyłek pszczeli (pierzga) pochodził z tego samego źródła i okresu.

W doświadczeniach z miodem z pożywki eliminowano glukozę cał-

kowiecie lub częściowo, zależnie od ilości dodawanego miodu. W innych kombinacjach pożywki usuwano składniki organiczne bądź mineralne. Zastosowanie pyłku jako dodatku do podłoża nie wymagało usunięcia glukozy. Do pożywki zasadniczej dodawano mniejsze lub większe ilości wyciągu pyłkowego i jak poprzednio eliminowano składniki mineralne bądź organiczne.

Wyciąg z pyłku pszczelego przygotowywano następująco: 20 g oczyszczonego od wosku pyłku dopełniano wodą do 100 ml i autoklawowano przez 15 minut. Po odsączeniu klarowny wyciąg dodawano do podłoża.

Każda seria doświadczeń wynosiła 16 równoległych prób, wzrost oceniano wizualnie po upływie czterech tygodni licząc od chwili przeszczepienia. Na tej samej pożywce badane tkanki utrzymywano przez kilka pasaży. Temperatura, w której rosły tkanki wynosiła 22—25°.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

W doświadczeniach z miodem tkankę tumora bakteryjnego tytoniu hodowano na następujących kombinacjach pożywek:

- 1) Pożywka zasadnicza, zawierająca wszystkie składniki = kontrola,
- 2) 1 g/l miodu + 19 g/l glukozy + pozostałe składniki jak w kontroli,
- 3) 12 g/l miodu + 10 g/l glukozy + pozostałe składniki jak w kontroli,
- 4) 25 g/l miodu + składniki mineralne jak w kontroli,
- 5) 25 g/l miodu + składniki organiczne jak w kontroli (z wyjątkiem glukozy),
- 6) 25 g/l miodu + agar.

Na pożywce 5 i 6 wzrost był minimalny, tkanki stawały się nekrotyczne i po dwu pasażach większość ich całkowicie zamierała. Na pozostałych pożywkach tkanki rozwijały się bardzo dobrze. Największy przyrost masy uzyskano na podłożu 4. Jednak ogólny wygląd tkanek przedstawiał się najlepiej na pożywce 3. Śnieżnobiała barwa, wysoki

Tabela 1—Table 1

Wzrost tkanki tumora bakteryjnego tytoniu na pożywkach z miodem
Growth of tobacco tumour tissues on the medium completed with honey

Numer pożywki	1*	2	3	4	5	6
Stopień wzrostu	++	+++	++++	++++	+-	-+

* Skład pożywek oznaczonych numerami podano w opisie doświadczeń +— minimum wzrostu; ++++ maksimum wzrostu.

stopień twardości oraz doskonała kondycja tkanek, skłoniły nas do uznania tej kombinacji podłoża za najkorzystniejszą. Podobnie wyglądały tkanki na pożywce 2, choć były nieco mniejsze aniżeli poprzednie. Ogólnie można stwierdzić, że wzrost tkanek na pożywkach 2, 3, 4,

Ryc. 1. Wpływ miodu na wzrost tkanki tumora bakteryjnego tytoniu in vitro
Effect of honey on the growth of tobacco tumour tissue in vitro

1 — Pożywka kontrolna White'a wg Pontowicza + cysteina HCl 10, 2 — 1 g/l miodu + 19 g/l glukozy + pozostałe składniki jak w kontroli, 3 — 12 g/l miodu + 10 g/l glukozy + pozostałe składniki jak w kontroli, 4 — 25 g/l miodu + składniki mineralne jak w kontroli, 5 — 25 g/l miodu + składniki organiczne z wyj. glukozy jak w kontroli, 6 — 25 g/l miodu + agar.

był znacznie silniejszy aniżeli w kontroli. Wyniki doświadczeń zebrano w tabeli 1 oraz zilustrowano na załączonej fotografii (ryc. 1).

Analogiczne doświadczenie z pyłkiem przeprowadzono stosując następujący układ pożywek:

- 1) Pożywka kontrolna identyczna jak w doświadczeniu z miodem,
- 2) 10 ml/l wyciągu + wszystkie składniki obecne w kontroli,
- 3) 2 ml/l wyciągu + wszystkie składniki obecne w kontroli,
- 4) 10 ml/l wyciągu + składniki mineralne jak w kontroli,
- 5) 10 ml/l wyciągu + składniki organiczne jak w kontroli,
- 6) 10 ml/l wyciągu + glukoza + agar,
- 7) 2 ml/l wyciągu + glukoza + agar.

Podobnie jak w doświadczeniu z miodem najintensywniejszy wzrost zaobserwowano na pożywce 4. Jednak za najkorzystniejszą uznano kom-

Tabela 2 — Table 2

Wzrost tkanki tumora bakteryjnego tytoniu na pożywkach z wyciągiem pyłkowym
Growth of tobacco tumour tissue on the medium completed with pollen extract

Numer pożywki	1	2	3	4	5	6	7
Stopień wzrostu	++	+++	++++	+++++	+	—	+

binację 3, ze względu na wygląd ogólny i kondycję tkanek wyrosłych na tym podłożu. Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli 2.

Dla tkanki tumora bakteryjnego *Crotolaria spectabilis* wypróbowano kilka pożywek. Stosunkowo najlepszy wzrost wykazywały tkanki hodowane na podłożu zawierającym ekstrakt drożdżowy. Jednak i w tym przypadku wygląd ogólny i tempo wzrostu badanych tkanek pozostawiały wiele do życzenia. Dopiero po wykonaniu doświadczenia z wyciągiem pyłkowym uzyskano optymalny wzrost tkanki tumorowej z *Crotolaria* sp. Pożywki doświadczałne zawierały składniki w następujących czterech kombinacjach:

- 1) Składniki White'a + ekstrakt drożdżowy = kontrola,
- 2) 1 ml/l wyciągu pyłkowego + składn. White'a + ekstrakt drożdżowy,
- 3) 10 ml/l wyciągu pyłkowego + składn. White'a + ekstrakt drożdżowy,
- 4) 10 ml/l wyciągu pyłkowego + składniki White'a.

Najlepiej rosły tkanki na pożywce 3, zawierającej zarówno ekstrakt drożdżowy, jak i wyciąg z pyłku pszczelego. Ten optymalny wzrost wyrażał się największym przyrostem masy, piękną zieloną barwą tkanek i jej doskonałą kondycją. Nieco lepiej niż w kontroli rosły tkanki na pożywce 2, do której podano wyciąg pyłkowy w bardzo nie-

Ryc. 2. Wpływ wyciągu z pyłku pszczelego na wzrost tkanki tumora bakteryjnego tytoniu in vitro

Effect of pollen extract on the growth of tobacco tumour tissue in vitro

1 — Pożywka kontrolna identyczna jak w dośw. z miodem, 2 — 10 ml/l wyciągu + wszystkie składniki obecne w kontroli, 3 — 2 ml/l wyciągu + wszystkie składniki obecne w kontroli, 4 — 10 ml/l wyciągu + składniki mineralne jak w kontroli, 5 — 10 ml/l wyciągu + składniki organicznej jak w kontroli, 6 — 10 ml/l wyciągu + glukoza + agar, 7 — 2 ml/l wyciągu + glukoza + agar.

Tabela 3 — Table 3

Wzrost tkanki tumora bakteryjnego *Crotolaria* sp. na pożywkach z wyciągiem pyłkowym

Growth of *Crotolaria* sp. tumour tissue on the medium completed with pollen extract

Numer pożywki	1	2	3	4
Tempo wzrostu	++	+++	++++	+-

+- minimum wzrostu; ++++ maksimum wzrostu.

wielkiej ilości. Prawie całkowite zahamowanie wzrostu tkanek oraz ich brunatnienie i zamieranie stwierdzono na podłożu 4. Nie zawierało ono ekstraktu drożdżowego. Wyniki niniejszego doświadczenia przedstawiono w tabeli 3.

DYSKUSJA

Już od dawna produkty pszczele wykorzystywane są jako wartościowe i łatwo przyswajalne pokarmy, a także jako skuteczne środki leczniczo-profilaktyczne. Szczególną popularność uzyskał miód, a w ostatnich latach duże zainteresowanie wywołuje mleczko pszczele oraz pyłek (pierzga). Odżywki z dodatkiem pyłku używane są jako środek dietetyczno-witaminowy (Wojtacki M. 1961).

Miód, obok mieszaniny cukrów kwalifikujących go do pokarmów węglowodanowych, zawiera około 0,5% składników mineralnych, których główną masę stanowią: potas, fosfor, chlor, wapń, siarka, żelazo. Z innych składników miodu wymienić należy kwasy organiczne (cytrynowy, jabłkowy, mlekowy, octowy, szczawiowy, masłowy, walerianowy i inne) oraz niewielkie ilości witaminów, głównie z grupy B (Majewski T. 1959).

Na podstawie tych danych można było przypuszczać, że miód wpływa korzystnie na wzrost tkanek roślinnych. Potwierdzają to w znacznym stopniu uzyskane wyniki. Wydaje się, że brak wzrostu tkanek na samym miodzie nie wymaga większych komentarzy (zbyt małe stężenie składników mineralnych w porównaniu z dużą ilością cukrów). Dodanie miodu do pożywki nie zastępuje usuniętych z niej składników mineralnych, może jednak wyrównać brak składników organicznych, w tym wypadku glukozy, witaminów, aminokwasów. Najoptymalniejszy wzrost tkanek zapewniły jednak pożywki o pełnym składzie uzupełniane miodem. Dwukrotnie większy w porównaniu z kontrolą wzrost tkanek na pożywkach z miodem wystarczająco potwierdza celowość wykorzystywania go do hodowli tego typu. Gdzie tkwi przyczyna sprzyjającego wzrostowi tkanek działania miodu, trudno powiedzieć. Zgodnie z przyjętym poglądem nie należy przeceniać tu roli witaminów. Można by sądzić, że pozytywny efekt przytoczonych do-

świadczeń pozostaje w związku z obecnymi w miodzie składnikami mineralnymi, a także kwasami organicznymi. Pogląd ten, rzecz jasna, wymaga głębszego udokumentowania.

W przeciwieństwie do miodu pyłek pszczeli zawiera duże ilości białek, kwasy nukleinowe (Markham R. 1955), witaminy grupy B, C, D, oraz rutynę (Wojtacki M. 1961). Podsumowując doświadczenia można stwierdzić, że korzystne działanie wyciągu pyłkowego na tkanki roślinne wyraża się prawie trzykrotnym w porównaniu z kontrolą zwiększeniem wzrostu oraz poprawieniem ogólnego wyglądu badanych tkanek. Podobnie jak miód, pyłek pszczeli nie wyrównuje braku w podłożu składników mineralnych, ale zastępuje nieobecne składniki organiczne (witaminy i aminokwasy). Najkorzystniej działa jednak w formie uzupełnienia do podłoża o pełnym składzie. Nieco silniejsze stymulowanie wzrostu przez pyłek aniżeli przez miód wynika prawdopodobnie z dość dużej koncentracji zawartych w nim składników (elementy mineralne, witaminy, białka). Jak się wydaje niepośrednią rolę odgrywają w tym wypadku obecne w pyłku kwasy nukleinowe.

Ponieważ doświadczenia niniejsze przeprowadzono na tkankach zaledwie dwu roślin, nie mamy zamiaru wyciągać zbyt uogólniających wniosków na temat znaczenia w hodowli kultur tkankowych produktów pszczelich. Podkreślić jednak należy korzystny wpływ wyciągu pyłkowego na wzrost tkanki tumora bakteryjnego *Crotolaria spectabilis*, która w naszych warunkach hoduje się bardzo trudno. Jeżeli nasze wyniki zostaną potwierdzone na tkankach wielu innych roślin wyższych, to można przypuszczać, że produkty pszczele będą mogły z powodzeniem konkurować ze stosowanym obecnie mlekiem kokosowym.

W następnej pracy z tej serii zostaną omówione wyniki badań nad wpływem mleczka pszczelego na wzrost tkanek roślinnych *in vitro*.

Kierownikowi Katedry Doc. Dr W. Potapczykowej serdecznie dziękujemy za cenne wskazówki i rady w czasie wykonywania niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Hodowano tkanki tumora bakteryjnego tytoniu i *Crotolaria* sp. na pożywkach uzupełnianych miodem lub wyciągiem z pyłku pszczelego (pięrzga). Oba produkty pobudzały wzrost tkanek 2—3-krotnie, prócz tego poprawiały ich kondycję i wygląd ogólny.

Przypuszcza się, że produkty pszczele znajdują zastosowanie w technice kultur tkankowych z roślin wyższych.

SUMMARY

Tobacco and *Crotolaria* sp. crown-gall tissues have been cultivated on the culture medium containing supplementary bee products. These products can greatly (2—3 times) stimulate the growth of tissues under examination. The general appearance of those tissues was much better than that of control.

It is supposed that bee products may be used for the technique of herbaceous plant tissue cultures.

LITERATURA

- Braun A. C., 1959, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45: 932—938.
Caplin S. M. and Steward F. C., 1948, Science 108: 655—657.
Czosnowski J., 1952, Pozn. Tow. Przyj. N., Wyd. Mat.-Przyr., Komisja Biol. 13: 31—38.
Gautheret R. J., 1939, C. R. Ac. Sc., 208, 18.
Hildebrandt A. C., Riker A. J. and Duggar B. M., 1946, Cancer Research 6: 368—377.
Hildebrandt A. C., Riker A. J. and Duggar B. M., 1946, Am. J. Botany, 33: 591—597.
Klein R. M., 1957, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 43: 956—960.
Majewski T., 1959, Miód pszczeli, Wyd. Przem. L. Spoż., Warszawa.
Markham R., 1955, Moderne Methoden der Pflanzen Anal., Spr. Verlag, s. 297.
Nickell I. G. and Tulecke W., 1960, J. Bioch. Microb. Techn. a. Eng., II, 287—297.
Pontowicz W. E., 1959, Fizjoł. Rastienii, 6: 307.
Ruge U., 1955, Prakt. po Fizj. Rosta Razw. Rastienii, Izd. Inostr. Lit., Moskwa, 86.
White P. R., 1939, Am. J. Botany, 26: 59—64.
Wojtacki M., 1961, Produkty pszczele, Por. Pszcz., PWRiL, 440—442.