

Kinetyka wzrostu embriogennej i nieembriogennej kultury zawieszinowej ogórka (*Cucumis sativus* L) w bioreaktorze

Paweł Króliczak

Włodzimierz Grajek

Michał Tomkowiak

Katedra Biotechnologii

i Mikrobiologii Żywności

Akademia Rolnicza

Poznań

1. Wstęp

Somatyczna embriogeneza roślin wzbudza coraz szersze zainteresowanie, szczególnie w perspektywie możliwości jej wykorzystania do produkcji tzw. sztucznych nasion (1,2). Dla realizacji tego celu konieczne jest powiększenie skali hodowli tkankowych i stosowanie przemysłowych bioreaktorów (3,4).

Somatyczna embriogeneza przebiega w dwóch fazach. Pierwszą z nich stanowi hodowla tkanki proembriogennej, której różnicowanie jest uniemożliwione przez obecność odpowiednich fitohormonów, drugą, hodowla w pożywkach inicjujących proces embriogenezy. Wymiana pożywki, obejmująca zwykle zmianę składu i stężenia kilku składników, z których fitohormony stanowią jeden z zasadniczych czynników regulatorowych, jest bodźcem wywołującym w sposób zsynchronizowany proces embriogenezy. Polega on na transformacji tkanki proembriogennej w embriony somatyczne. Ich wzrost obejmuje kilka faz morfologicznych, w tym: owalną, sercową i kończy się osiągnięciem fazy tzw. torpeda, uznawanego za formę dojrzałą. Efektywność tworzenia embriónów somatycznych zależy przede wszystkim od jakości tkanki proembriogennej. Warto podkreślić, że cecha embriogenności może być utracona przez długotrwałe pasażowanie tkanki.

Wzrost kultury zawieszinowej jest zwykle charakteryzowany przez kilka podstawowych parametrów, takich jak: kinetyka namnażania biomasy komórkowej, udział poszczególnych form morfologicznych komórek w całej populacji, szybkość zużycia źródła węgla i energii, wykorzystanie pożywki azotowej, zmiany pH pożywki, stan nasycenia pożywki tlenem oraz dwutlenkiem węgla. Opierając się na bilansach materiałowych i dynamice zmian gęstości biomasy

proponowane są matematyczne modele wzrostu kultury tkankowej. Sprawdzają się one najlepiej w ciągłych i okresowo-dolewowych metodach hodowli, mniej zaś w kulturach okresowych (5-9).

Jedną z ważniejszych roślin uprawnych w Polsce jest ogórek. Pierwsze doniesienie o zdolności tej rośliny do embriogenezy somatycznej opublikował Malepszy i współ. (10). W następnych latach ukazały się dalsze publikacje dotyczące embriogenezy somatycznej u *Cucumis sativus* (11-15). W prezentowanych danych wskazujemy, że embriogeneza u tej rośliny zachodzi z małą częstotliwością i notowane są różne nienormalności w tym procesie, jak np. ustawianie wzrostu w fazie niedojrzałej, zakłócenia w polarnośći embrionów, powrót do kalusa i in. Brakuje, jak dotąd, także doniesień o udanej embriogenezie somatycznej ogórka przeprowadzonej w skali bioreaktora.

W prezentowanej pracy przedstawiono badania porównawcze dotyczące hodowli zawieszinowej tkanki embriogennej i nieembriogennej ogórka w skali bioreaktora o pojemności 5 l. Celem badań było zebranie danych na temat kinetyki wzrostu oraz metabolizmu cukrów i azotu przez oba typy tkanki.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał roślinny

W pracy stosowano embriogenną i nieembriogenną tkankę ogórka linii Borszczagowski, hodowaną w kulturze zawieszinowej. Kultury zawieszinowe były wyprowadzone z tkanki kalusowej*. Ustalone linie komórkowe utrzymywano w pożywce płynnej Murashige i Skoog'a (1/2 MS) (16).

Kulturę przeszczepiano na świeżą pożywkę co 7-10 dni, stosując wysiew w ilości 30% v/v. Hodowla była prowadzona w kolbach Erlenmeyera o poj. 300 ml, zawierających 100 ml świeżej pożywki na wytrząsawce w temp. 28°C przy 160 obr/min, stosując fotoperiod 16 h. Uzyskana 7-dniowa kultura zawieszinowa była stosowana jako inoculum do zaszczepiania bioreaktorów.

2.2. Warunki hodowli

Hodowlę prowadzono w bioreaktorze typu Bioflo III, New Brunswick Sci. (USA), o pojemności roboczej 5 l, wyposażonym w pojedyncze, trzyplątowe mieszadło typu śruby okrętowej. Kontroli podlegały: szybkość mieszania, temperatura pożywki, pH pożywki i szybkość napowietrzania. Reaktor był napełniony pożywką MS i sterylizowany w autoklawie przy 121°C przez 1 h. Po wychłodzeniu do temp. 28°C reaktor zaszczepiano 20% objętością inoculum

* Obie linie komórkowe otrzymano dzięki uprzejmości prof. dra hab. S. Malepszego i dra W. Bury z AR-SGGW, Warszawa.

w formie kultury zawieszinowej uzyskanej w 7-dniowych hodowlach wytrząsanych. W czasie hodowli utrzymywano napowietrzanie z szybkością 0,5 l/min i mieszanie 80 obr/min.

Proces prowadzono za pomocą metody okresowej, bez regulacji pH. Co 24 godziny pobierano próbkę w ilości 80 ml w celu przeprowadzenia analiz, obejmujących oznaczanie stężeń: biomasy komórkowej, sacharozy i glukozy, źródła azotu w formie jonów amonowych i jonów azotanowych. Ponadto określano formy morfologiczne rosnącej tkanki.

2.3. Metody analityczne

2.3.1. Oznaczanie biomasy komórkowej

Pożywkę pobraną z bioreaktora wirowano przy 12 tys. obr/min przez 15 min. Uzyskany osad po przemyciu wodą był suszony przez 24 godziny w temp. 60°C, a następnie do stałej masy w 105°C. Stężenie biomasy komórkowej wyrażano jako g s.m./l pożywki.

2.3.2. Oznaczanie stężenia cukrów

Stężenie cukrów oznaczano na chromatografii cieczowym Hewlett-Packard HP 1050 z detektorem RI (Hewlett-Packard 1047A). Stosowano kolumnę Adsorbosphere C18 (150 x 4,6 mm, Alltech) z prekolumną. Jako eluentu stosowano wodę dejonizowaną przy przepływie 0,8 ml/min. Oznaczenia prowadzono w temperaturze pokojowej przy czułości detektora 8×10^{-5} RIU/F.S.

Wyniki przedstawiano jako cukry ogółem obejmujących sumę sacharozy, glukozy i fruktozy (17).

2.3.3. Oznaczanie form azotu

Azot amonowy oznaczano poprzez destylację amoniaku po zalkalizowaniu próbki pożywki za pomocą NaOH, a następnie miareczkowanie jonów NH_4^+ przy użyciu 0,1 N kwasu solnego (18).

Azot azotanowy oznaczano przy użyciu wysokociśnieniowego chromatografu cieczowego Hewlett-Packard HP1050 z detektorem UV (HP1050). Stosowano kolumnę APS-Hypersil (200 x 4,6 mm, Hewlett-Packard) z prekolumną. Jako eluent stosowano H_2O z 0,2 ml H_2SO_4 i 0,005 M KH_2PO_4 o pH 3,3. Kolumnę utrzymywano w temperaturze 40°C. Oznaczenie prowadzono przy długości fali 210 nm (19).

Sumę azotu zawartego w jonach amonowych i azotanowych określano jako azot całkowity. Wyniki analiz były prezentowane jako średnie arytmetyczne z trzech powtórzeń.

2.3.4. Oznaczanie pH

Wartość pH pożywki była mierzona w sposób ciągły. Do oznaczania stosowano elektrodę kombinowaną firmy Ingold, przystosowaną do sterylizacji termicznej.

2.3.3. Morfologia tkanki zawieszinowej

Ocenę struktury tkanki zawieszinowej przeprowadzano co 72 godzin, stosując analizę mikroskopową w mikroskopie odwróconym typu Nikon przy 100-krotnym powiększeniu. Przy określaniu struktury tkanki wyróżniano komórki pojedyncze, małe agregaty obejmujące do kilkunastu komórek oraz duże agregaty składające się z kilkudziesięciu komórek.

3. Wyniki i dyskusja

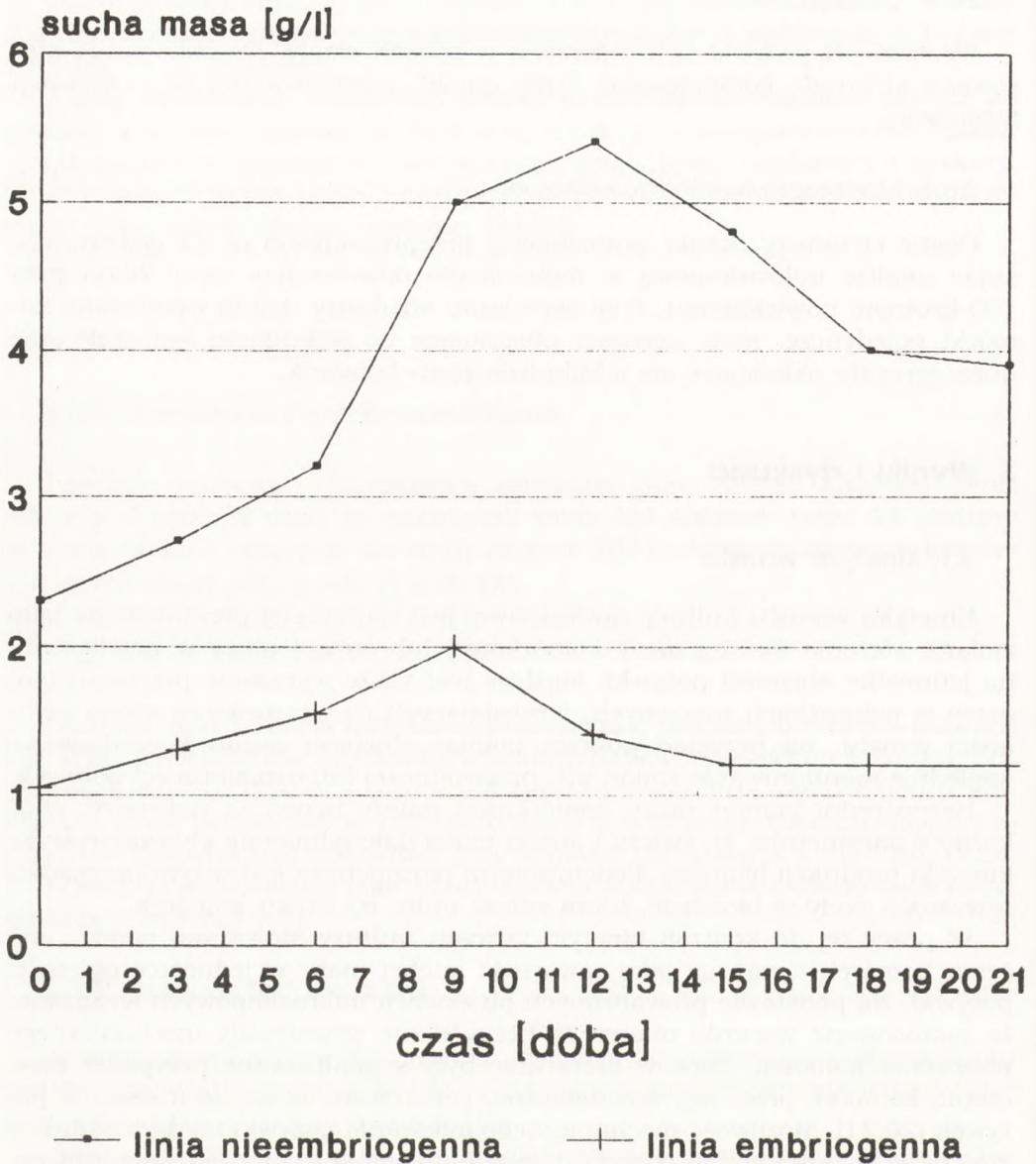
3.1. Kinetyka wzrostu

Kinetyka wzrostu kultury zawieszinowej jest najczęściej prezentowana jako zmiana stężenia świeżej masy komórkowej lub suchej masy w przeliczeniu na jednostkę objętości pożywki. Możliwe jest także wyrażanie przyrostu biomasy w jednostkach umownych, pozwalających na szacunkową ocenę szybkości wzrostu, na przykład poprzez pomiar objętości osadu komórkowego, względnie monitorowanie zmian pH, przewodności lub osmolarności pożywek.

Bezpośredni pomiar masy komórkowej należy uznać za najlepszy, choć każdy z parametrów, tj. świeża i sucha masa daje odmienną charakterystykę kinetyki produkcji biomasy. Podstawowym parametrem jest w tym przypadku zawartość wody w biomacie, która zależy m.in. od wieku komórek.

W pracy tej do kontroli kinetyki wzrostu kultury stosowano pomiar stężenia komórek wyrażany jako zawartość suchej masy w jednostce objętości pożywki. Na podstawie prowadzonych obserwacji mikroskopowych wykazano, że zastosowane warunki mieszania pożywki nie wywoływały mechanicznego niszczenia komórek, choć w literaturze były sygnalizowane przypadki niszczenia komórek przez siły mechaniczne, generowane w czasie mieszania pożywek (20,21). Możliwość mechanicznego mieszania pożywki miała zasadnicze znaczenie w zapewnieniu odpowiedniego natlenienia i homogenności kultury, co, jak wskazują badania innych autorów, warunkuje niehamowany wzrost komórek w fazie namnażania biomasy komórkowej przed indukcją embriogenezy (22,23).

Porównanie kinetyki wzrostu embriogennej i nieembriogennej kultury ogórka w bioreaktorze przedstawiono na rys. 1. Różnice w początkowym stężeniu biomasy obu kultur wynikały ze stosowania jednakowej objętości materiału posiewowego, różniącego się jednak zawartością masy komórkowej. Stwierdzono, że szybkość wzrostu linii nieembriogennej jest znacznie większa niż



Rys.1. Kinetyka wzrostu embriogennej i nieembriogennej kultury zawieszinowej ogórka.

linii embriogennej. Największe stężenie biomasy komórkowej w kulturze nie-embriogennej uzyskano w dwunastej dobie hodowli i wyniosło ono 5,4 g s.m./l, podczas gdy największa koncentracja biomasy w kulturze embriogennej wystąpiła w dziewiątej dobie hodowli, lecz była ponad dwukrotnie niższa i wynosiła zaledwie 2 g s.m./l. Od momentu osiągnięcia plateau w obu kulturach

obserwowano stałe zmniejszanie się koncentracji komórek w kolejnych dobach hodowli. Biorąc pod uwagę trzytygodniowy okres hodowli, przyrost biomasy komórkowej w kulturze nieembriogenicnej wyniósł ok. 2,5 g s.m./l, tj. ok. 110% masy wprowadzonej do bioreaktora, podczas gdy w kulturze embriogenicnej przyrost biomasy wyniósł zaledwie 18%.

Dane literaturowe na temat kinetyki wzrostu embriogenicnych kultur zawieszinowych w bioreaktorach są bardzo skąpe. Badania porównawcze nad wzrostem embriogenicnych i nieembriogenicnych linii komórkowych jęczmienia i kukurydzy prowadzili Stirn i współ. (24). Stwierdzili oni, że linie nieembriogeniczne wykazują znacznie szybszy wzrost niż embriogeniczne. W przypadku jęczmienia w pierwszych sześciu dniach hodowli linia embriogeniczna produkowała więcej biomasy niż nieembriogeniczna, następnie jednak linia nieembriogeniczna wykazała znacznie większą szybkość wzrostu, tak że po upływie czterech dni hodowli różnica w stężeniu świeżej biomasy między obu kulturami zawieszinowymi sięgała ponad 300%. W hodowlach tkanki kukurydzy od samego początku szybszy wzrost wykazała linia nieembriogeniczna, przy czym różnice w stężeniu komórek w porównywanych kulturach zwiększały się z upływem czasu hodowli.

Biorąc pod uwagę wyniki obu prac można sugerować hipotezę, że szybkość wzrostu danej kultury zawieszinowej może być wskaźnikiem jej potencjału embriogenicnego; wolny wzrost może wskazywać na zdolność danej linii komórkowej do somatycznej embriogenezy.

Tautorus i współ. (25) prowadzili hodowle kultur zawieszinowych świerków *Picea mariana* i *Picea glauca-engelmannii*, stosując bioreaktor z mieszadłem turbinowym o pojemności 7,5 l. Autorzy nie stwierdzili uszkodzenia komórek w czasie mieszania pożywki. Kinetyka wzrostu obu badanych linii komórkowych była zależna od stężenia sacharozy w pożywce, przy czym maksymalna koncentracja komórek osiągnęła poziom 4-6 g/l. Niestety autorzy nie podają informacji o potencjale embriogenicnym tej kultury.

3.2. Morfologia tkanki

Dane literaturowe dotyczące embriogenezy somatycznej wskazują na podstawową rolę w tym procesie komórek o wysokiej gęstości cytoplazmy (2). Komórki te występują zwykle w małych, agregatach komórkowych. W hodowlach, których celem jest produkcja embrionów, udział tej frakcji w ogólnej populacji komórek jest ważną wskazówką mówiącą o zdolnościach embriogenicnych danej linii komórkowej, stąd też w prezentowanej pracy, obok przyrostu biomasy komórkowej, określano także stężenie poszczególnych form morfologicznych w pożywce. Wyniki tych badań są przedstawione w tab. 1 i na rys. 2.

TABELA 1

STĘŻENIE POSZCZEGÓLNYCH FORM MORFOLOGICZNYCH TKANKI EMBRIOGENNEJ I NIEEMBRIOGENNEJ W POŻYWCIE

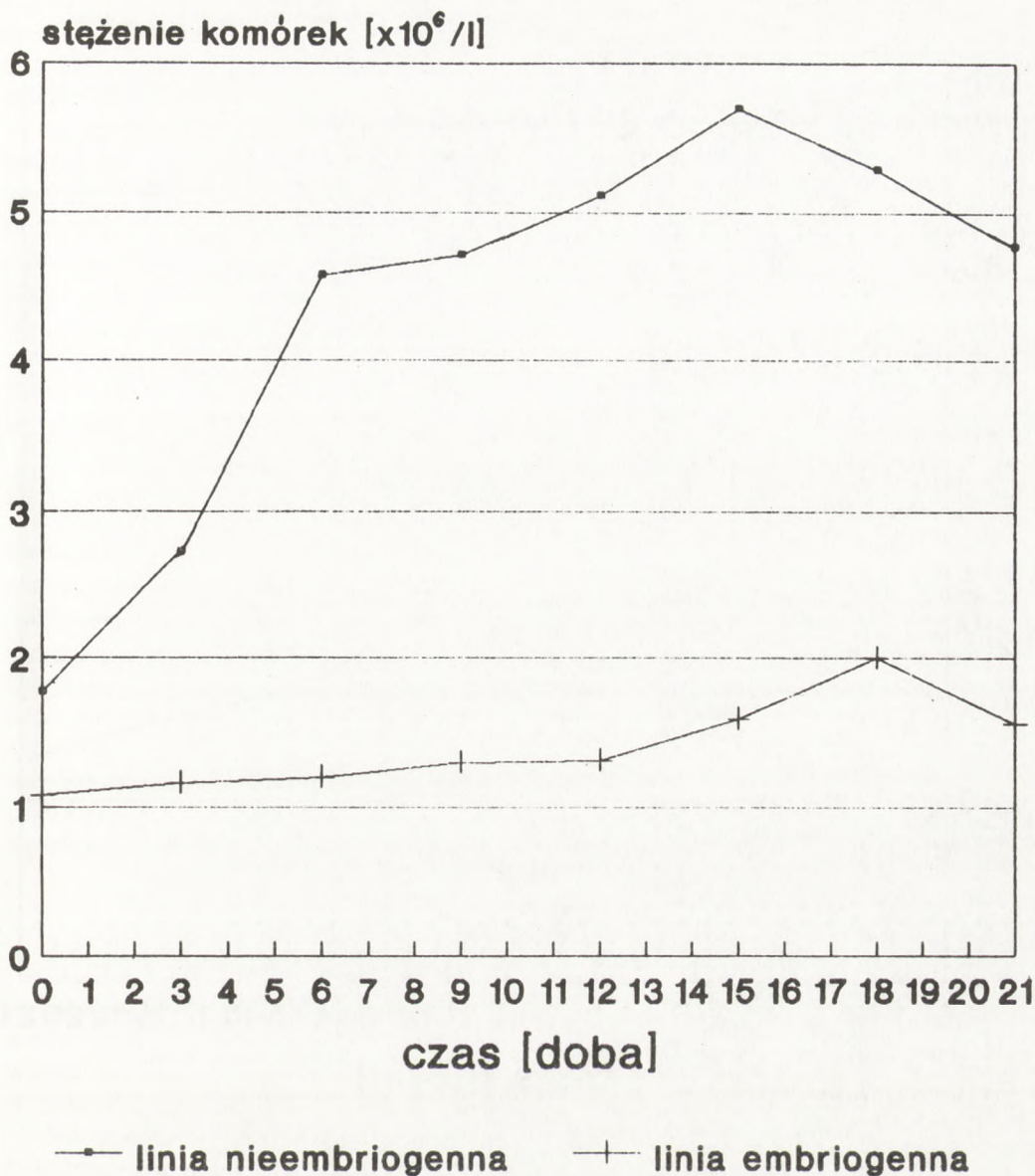
Czas (dni)	Linia embriogenna			Linia nieembriogenna		
	Liczba poszczególnych form, $\times 10^6/l$					
	Pojedyncze komórki	Małe agregaty	Duże agregaty	Pojedyncze komórki	Małe agregaty	Duże agregaty
0	1,08	0,22	0,07	1,77	0,31	0,08
3	1,16	0,15	0,23	2,72	0,38	0,20
6	1,20	0,12	0,06	4,56	0,56	0,40
9	1,30	0,28	0,20	4,70	0,60	0,41
12	1,31	0,16	0,13	5,11	0,78	0,34
15	1,59	0,10	0,09	5,69	0,78	0,48
18	2,00	0,13	0,08	5,28	1,10	0,56
21	1,56	0,12	0,08	4,76	1,20	0,97

Porównując obie stosowane linie komórkowe należy stwierdzić, że stężenie komórek w kulturze nieembriogennej jest znacznie większe niż w embriogennej. Jest to szczególnie widoczne przy analizie danych dotyczących komórek pojedynczych (rys. 2). Różnice w koncentracji pozostałych form są znacznie mniejsze.

Biorąc pod uwagę dużą ilość pojedynczych komórek w kulturze nieembriogennej, stwierdzić można, że udział małych agregatów w całej populacji komórek jest większy w kulturze linii embriogennej. Potwierdza to tezę o ważnej roli mniej zagregowanych form w tworzeniu somatycznych embrionów.

Uzyskane dane wskazują jednocześnie na szybkie zmniejszanie się gęstości cytoplazmy komórkowej, gdyż po osiągnięciu plateau stężenia biomasy w pożywce, liczebność komórek w jednostce objętości roboczej bioreaktora nadal rośnie, natomiast stężenie biomasy maleje. W przeprowadzonych badaniach mikroskopowych wykazano, że przyczyną tego zjawiska są powiększające się wakuole komórkowe, wskazujące na rosnący udział wody w masie komórkowej.

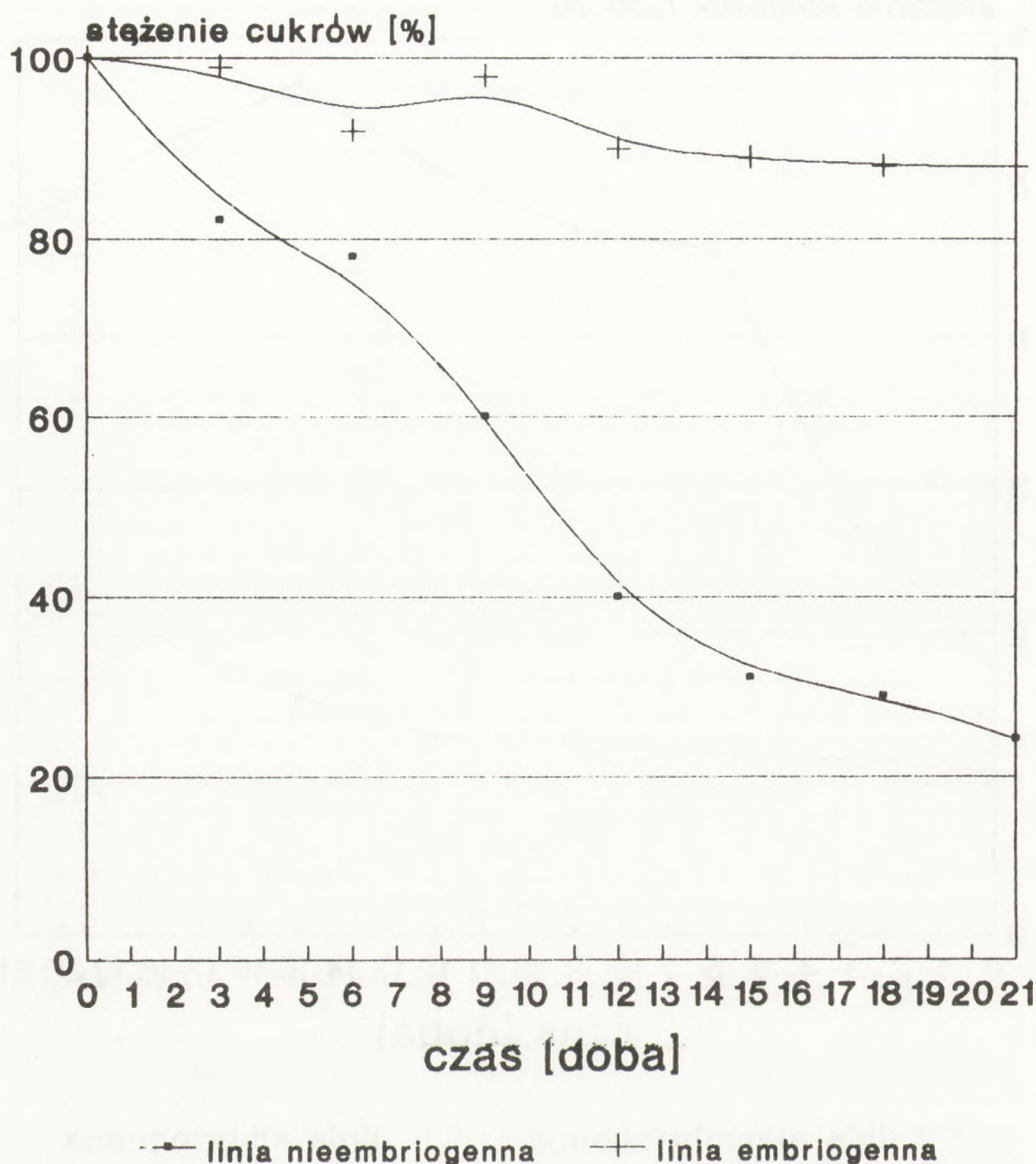
W literaturze brak jest szerszych informacji na temat agregacji komórek roślinnych rosnących w kulturze zawieszinowej hodowanej w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym. Uzyskane wyniki potwierdzają w dużym zakresie dane zebrane w prowadzonych hodowlach wytrząsanych i wskazują, że umiejętne mieszanie pożywki, polegające na stosowaniu mieszadła generującego małe stropy mechaniczne (śruba okrętowa) oraz umiarkowana szybkość mieszania nie przekraczająca 100 obr/min, pozwala na zachowanie naturalnej struktury tkanki, obejmującej zarówno pojedyncze komórki, jak i agregaty o zróżnicowanej wielkości.



Rys. 2. Zmiany stężenia pojedynczych komórek w kulturze zawieszinowej ogórka.

3.3. Kinetyka metabolizmu cukrów

Zmiany stężenia cukrów w pożywce w czasie hodowli przedstawiono na rys. 3. Analizując przemiany cukrów przez kulturę zawieszinową ogórka należy podkreślić znaczną różnicę w szybkości ich pobierania przez obie stosowane



Rys. 3. Procentowe zmiany stężenia cukrów w pożywce w czasie hodowli kultury zawieszinowej ogórka.

kultury zawieszinowe. Zużycie cukrów przez kulturę embriogenną było bardzo małe i w ciągu 21 dni hodowli wyniosło zaledwie 12% w stosunku do stężenia początkowego, co odpowiadało zużyciu około 3,48 g cukrów/l. Pobieranie cukrów przez tę kulturę przebiegało w sposób względnie równomierny w całym

okresie wzrostu, chociaż po osiągnięciu plateau, tj. po dziewiątej dobie hodowli, przez kolejnych pięć dni obserwowano niewielkie przyspieszenie zużycia cukrów. Przez cały okres hodowli stwierdzano obecność w pożywce wszystkich trzech cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy.

Nieembriogeniczna linia komórkowa charakteryzowała się znacznie intensywniejszym metabolizmem cukrów. Do czternastej doby hodowli obserwowano szybkie zużycie cukrów, po czym następowała faza nieco zwolnionego metabolizmu. Należy przy tym zaznaczyć, że po upływie 12-13 dni hodowli nastąpiło całkowite wyczerpanie sacharozy, natomiast do końca hodowli w pożywce obecna była glukoza i fruktoza. Biorąc pod uwagę cały okres hodowli zużyciu uległo 76% cukrów, co odpowiada około 34,1 g cukrów/l. Największe przyspieszenie zużycia cukrów odnotowano między szóstą a piętnastą dobą hodowli. Porównując obie linie komórkowe, kultura nieembriogeniczna pobrała w czasie hodowli 10-krotnie więcej cukrów niż embriogeniczna.

Na podkreślenie zasługuje brak prostego związku między szybkością zużycia cukrów a szybkością produkowanej biomasy komórkowej.

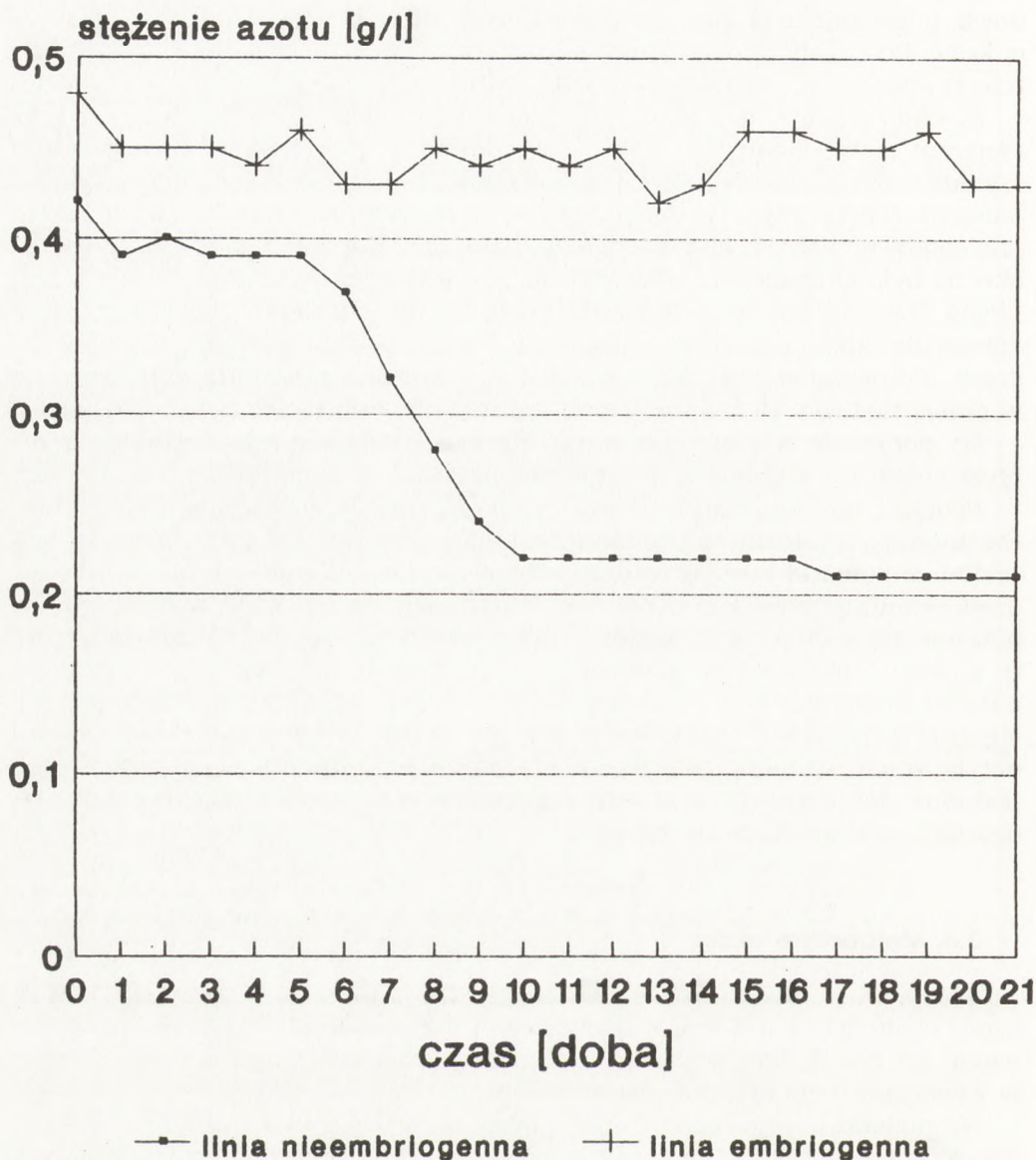
Podobne badania nad kinetyką przemian cukrów w roślinnej kulturze zawieszinowej prowadzili McDonald i Jackman (26). Autorzy ci hodowali w bioreaktorze komórki lucerny wyprowadzone z kalusa. Wyniki ich pracy potwierdzają rezultaty uzyskane w naszych badaniach. Następowało szybkie wyczerpywanie się sacharozy w podłożu i nagromadzanie się obu cukrów prostych, tj. glukozy i fruktozy. W momencie całkowitego zużycia sacharozy rozpoczęło się pobieranie obu cukrów prostych, co objawiało się zmniejszaniem ich stężenia w pożywce. Można stwierdzić, że profile krzywych obrazujących kinetykę zmian stężenia poszczególnych cukrów w kulturze lucerny były bardzo podobne do przebiegu krzywych kinetycznych w nieembriogenicnej kulturze ogórka, uzyskanych w tej pracy.

3.4. Metabolizm azotu

Głównym źródłem azotu w pożywce był azotan amonowy. Zmiany stężenia azotu ogólnego (suma azotu amonowego i azotanowego) w pożywce przedstawiono na rys. 4. Różnice w początkowym stężeniu azotu wynikały z różnic w zawartości tego składnika w inoculum.

Na podstawie przeprowadzonej analizy danych wynika, że kultura nieembriogeniczna metabolizowała azot znacznie szybciej niż embriogeniczna. Największy pobór azotu przez kulturę nieembriogeniczną odnotowano między czwartą a dziewiątą dobą hodowli. W całym okresie hodowli pobrane zostało ponad 0,2 g azotu/l, co stanowi 50% całości azotu wprowadzonego do pożywki. Biorąc pod uwagę obie formy azotu, należy stwierdzić, że azot amonowy jest szybciej pobierany przez komórki niż azot azotanowy. Gromadzenie się grup azotanowych w pożywce miało decydujący wpływ na szybki spadek pH.

Odmienny przebieg miała krzywa ilustrująca kinetykę pobierania azotu przez kulturę embriogeniczną, gdzie największy spadek stężenia azotu wystąpił



Rys. 4. Zmiany stężenia azotu w pożywce w czasie hodowli kultury zawieszinowej ogórka.

w pierwszych dobach hodowli. Po tym czasie poziom azotu w pożywce oscylował w wąskim zakresie stężenia między 0,42 a 0,46 g azotu/l. Zużycie azotu w ciągu trzech tygodni hodowli wynosiło zaledwie 0,06 g/l, co stanowiło 12,5% całości tego składnika w pożywce.

Na uwagę zasługują różnice w pobieraniu azotu przez obie kultury w pierwszych czterech dobach hodowli. W kulturze nieembriogenicnej zmiany w stężeniu azotu były relatywnie małe i dopiero po tym czasie następowało szybkie zużywanie azotu, podczas gdy w kulturze embriogenicnej największy pobór azotu miał miejsce w początkowym okresie hodowli.

Uwagę zwraca duże podobieństwo kinetyki pobierania azotu i cukrów przez obie kultury, przy jednoczesnym braku związku między szybkością pobierania składników pokarmowych i produkcją biomasy komórkowej.

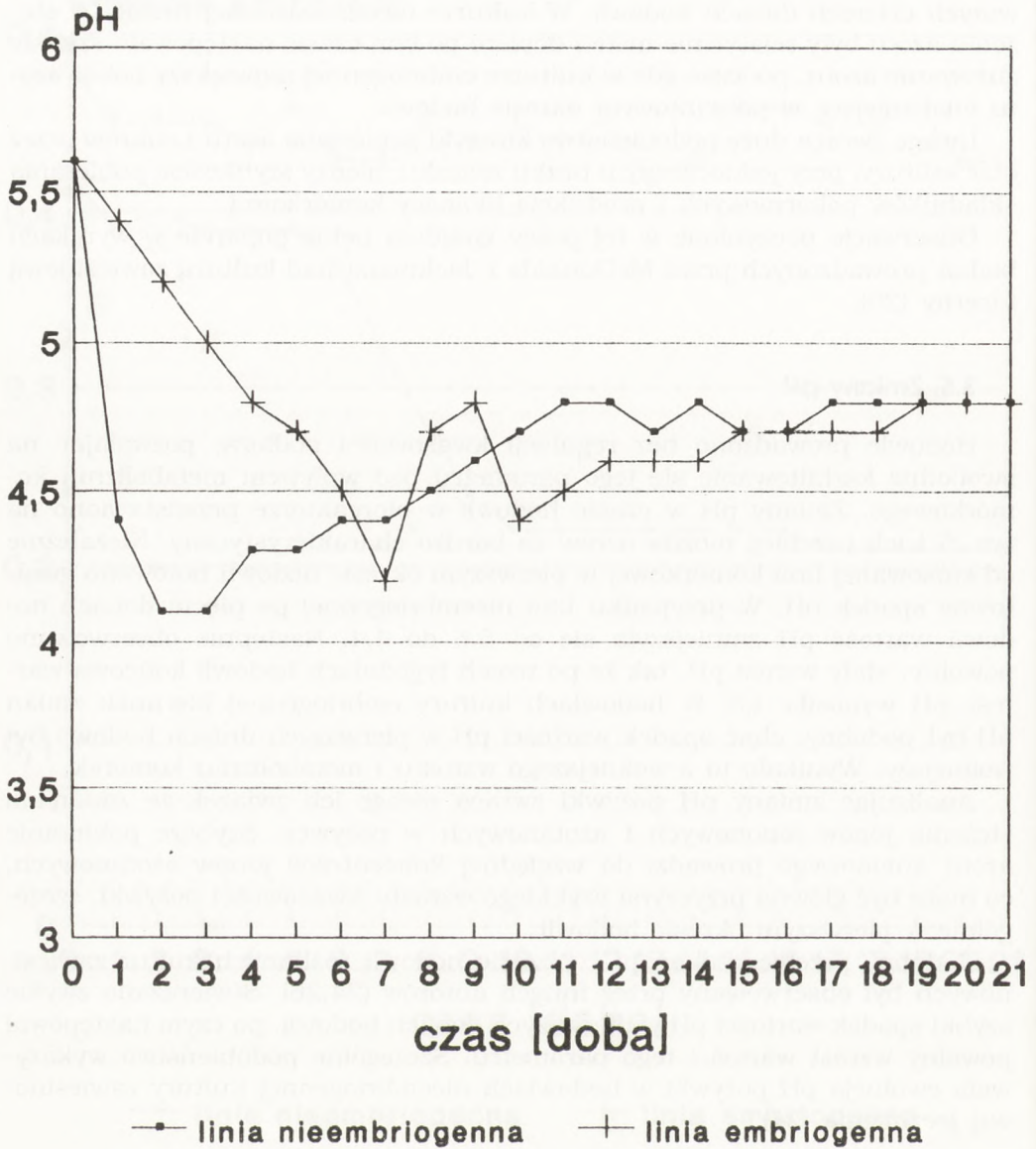
Obserwacje poczynione w tej pracy znajdują pełne poparcie w wynikach badań prowadzonych przez McDonalda i Jackmana nad kulturą zawieszinową lucerny (26).

3.5. Zmiany pH

Hodowle prowadzono bez regulacji kwasowości podłoża, pozwalając na swobodne kształtowanie się tego parametru pod wpływem metabolizmu komórkowego. Zmiany pH w czasie hodowli w bioreaktorze przedstawiono na rys. 5 i ich przebieg można uznać za bardzo charakterystyczny. Niezależnie od stosowanej linii komórkowej w pierwszym okresie hodowli notowano gwałtowny spadek pH. W przypadku linii nieembriogenicnej po pięciu dobach hodowli wartość pH zmniejszyła się od 5,6 do 4,4. Następnie obserwowano powolny, stały wzrost pH, tak że po trzech tygodniach hodowli końcowa wartość pH wynosiła 4,8. W hodowlach kultury embriogenicnej kierunek zmian pH był podobny, choć spadek wartości pH w pierwszych dniach hodowli był wolniejszy. Wynikało to z wolniejszego wzrostu i metabolizmu komórek.

Analizując zmiany pH pożywki zwraca uwagę ich związek ze zmianami stężenia jonów amonowych i azotanowych w pożywce. Szybsze pobieranie azotu amonowego prowadzi do względnej koncentracji jonów azotanowych, co może być główną przyczyną szybkiego wzrostu kwasowości pożywki, szczególnie w pierwszym okresie hodowli.

Podobny przebieg zmian pH w czasie hodowli roślinnych kultur zawieszinowych był obserwowany przez innych autorów (24,26). Stwierdzano zwykle szybki spadek wartości pH w pierwszych dobach hodowli, po czym następował powolny wzrost wartości tego parametru. Szczególne podobieństwo wykazywała ewolucja pH pożywki w hodowlach nieembriogenicnej kultury zawieszinowej jęczmienia (24).



Rys. 5. Zmiany pH w pożywce w czasie hodowli kultury zawieszinowej ogórka.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania nad hodowlą embriogennych i nieembriogennych kultur ogórka wskazują na odmienny metabolizm obu typów komórek. Różnice wystąpiły we wszystkich badanych wskaźnikach kinetycznych: szybkości

produkcji biomasy komórkowej, metabolizmu cukru i azotu oraz szybkości zmian pH pożywki.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kultura nieembriogenna rośnie szybciej i pobiera większe ilości składników pokarmowych, w tym azotu i cukrów. Udział pojedynczych komórek i małych agregatów w ogólnej liczbie komórek jest większy w kulturze linii embriogennej.

Rezultaty tej pracy oraz dane literaturowe uprawniają do postawienia hipotezy, że szybkość wzrostu danej kultury zawieszinowej może być wskaźnikiem jej potencjału embriogennego; wolny wzrost może wskazywać na zwiększoną zdolność danej linii komórkowej do somatycznej embriogenezy. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych potwierdzeń.

Stwierdzono, że przemiany cukrów są dwukierunkowe, obejmujące szybką hydrolizę sacharozy do cukrów prostych oraz jednocześnie pobieranie przez komórki glukozy i fruktozy.

Spośród dwóch form azotu obecnych w pożywce szybciej metabolizowany był azot amonowy, natomiast jony azotanowe pozostające w pożywce były prawdopodobną przyczyną obniżania się pH pożywki.

Nie stwierdzono prostej zależności między szybkością produkcji biomasy komórkowej a szybkością zużycia cukrów i azotu przez obie stosowane kultury ogórka.

Autorzy dziękują mgr Jolancie Theus-Sobańskiej, mgr Annie Mueller i Ryszardowi Stefańskiemu za pomoc w realizacji badań.

Praca była wykonana w ramach grantu nr 5.5032.92.03 p/03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Malepszy S., (1988), *Postepy Nauk Rolniczych*, 4, 3-15.
2. Redenbaugh K., (1993), *Synseeds. Applications of synthetic seed to crop improvement*, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
3. Denchev P. D., Kuklin A. I., Scragg A. H., (1992), *J. Biotechnol.*, 26, 99-109.
4. Ducos J.-P., Bollon H., Petiatd V., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 465-470.
5. Bailey C. M., Nicholson H., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1331.
6. Bramble J. L., Graves D. J., Brodelius P., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 859.
7. Gulik van W. M., ten Hoopen H. J. G., Heijnen J. J., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 863-874.
8. Gunst de M. C. M., Harkes P. A. A., Val J., van Zwet W. R., Libbenga K. R., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 61-71.
9. Hong Y. C., Labuza T. P., Harlander S. K., (1989), *Biotechnol. Prog.*, 5, 137-143.
10. Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., Wiszniewska J., (1982), *Acta Biologica*, 10, 218-220.
11. Malepszy S., Nadolska-Orczyk A., (1983), *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 111, 273-276.
12. Lou H., Kako S., (1994), *Hort Science*, 29, 906-909.
13. Bergervoet J. H. W., van der Mark F., Custers J. B. M., (1989), *Plant Cell Cell Rpt.*, 8, 116-119.
14. Cade R. M., Wehner T. C., Blazich F. A., (1990), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115, 691-696.
15. Chee P. P., (1990), *Hort Science*, 25, 792-793.

16. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
17. Evans A. J., Cheung P. C-K., (1993), *J. Sci. Food Agric.*, 61, 189-194.
18. Krelowska-Kułas M., (1993), *Badanie jakości produktów spożywczych*, PWE, Warszawa.
19. Schuster R., (1986), *HPLC Application*, Hewlett Packard, Publication Number 12-5954-6258.
20. Scragg A. H., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 82-85.
21. Scragg A. H., Ashton S., York A., Bond P., Stepan-Sarkissian G., Grey D., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 292-298.
22. Jay V., Genestier S., Courduroux J.-C., (1992), *Plant Cell Reports*, 11, 605-608.
23. Kessell R. H. J., Carr A. H., (1972), *J. Expt. Bot.*, 23, 996-1007.
24. Stirn S., Hopstock A., Loerz H., (1994), *J. Plant Physiol.*, 144, 209-214.
25. Tautorus T. E., Lulsdorf M. M., Kikcio S. I., Dunstan D. I., 1992, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 46-51.
26. McDonald K. A., Jackman A. P., (1989), *Plant Cell Reports*, 8, 455-458.

Growth kinetics of embriogenic and nonembriogenic suspension cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in stirred bioreactor

Summary

Embriogenic and nonembriogenic suspension cultures of cucumber were cultivated in a 5-L stirred bioreactor. Significant differences between kinetic characteristics of these cell lines (growth rate, tissue morphology, sugar and nitrogen metabolism) are presented.

Nonembriogenic culture demonstrated faster growth rate and greater nutrient uptake. Mechanical stress in stirred bioreactor under experimental conditions was negligible.

Key words:

embriogenic cultures, bioreactor, growth kinetics, *Cucumis sativus*.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.