

**Diss. ETH No. 9766**

**THE EFFECTS OF THREE MICRO-NUTRIENTS, (BORON, MANGANESE,  
AND IODINE) INDOLE ACETIC ACID, AND ASCORBIC ACID IN  
THE CULTURE MEDIUM ON THE GROWTH OF TOMATO  
CELLS IN SUSPENSION CULTURE**

**A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences**

**presented by**

**P.S.J.W. SERESINHE**

**Dipl. Ing. Agr. ETH  
born May 27, 1949  
citizen of Sri-Lanka**

**accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. J.J. Oertli, examiner  
Dr. J.E. Schmid, co-examiner**

**Zurich, 1992**

study the effects of Murashige and Skoog media-components (boron, manganese and iodine) and non media components (indole acetic acid and ascorbic acid) on the growth and development of tomato cells in suspension culture.

## 2 SUMMARY

The effects of boron (B), manganese (Mn), iodine (I), indole acetic acid (IAA) and ascorbic acid (AsA) in culture medium on the growth of tomato cells in suspension culture were investigated.

No increase in cell biomass was observed after 4 days without added B in medium. The highest biomasses were obtained at media B levels of 0.09 and 0.55 mM. Both low (0.005 - 0.007 mM) and high (2.30 - 4.15 mM) media B levels produced low cell biomasses. Media B levels of 1.85 mM or higher caused toxicity of cells. Depending on the B concentration in medium and the length of exposure, two observations were made. Firstly cells starved of B absorb this element from medium within a few hours. Secondly, the cells come into a almost near equilibrium with the media B levels. A very large part of the absorbed B by cells could be leached out and only very minute quantities were left in the cells. In the presence of metabolic inhibitors the B concentration in the cells and in the medium were almost at an equilibrium. These results indicated that B enters cells through passive transport and that an equilibrium exists between the cells and the medium.

In spite of a 50 fold concentration difference in medium, no differences in the biomass produced or dry weight of cells were observed with cells grown either with 0.002 or 0.1 mM Mn. Cells cultured with no added Mn (deficiency) and 0.2 mM (toxicity) Mn in the medium produced low biomasses. Deficiency as well as toxic levels of Mn in the medium had large effects on the rate of cell division as well as on cell viability. Cells grown in the presence of 0.2 mM Mn had low levels of Zn, Cu, and Fe whereas cells cultured with no added Mn in the medium had higher levels of these three micro-nutrients.

Though the biomass or dry weight produced were not significant with I<sup>-</sup> levels of 0, 5, 7.5 µM in medium, this element showed a stimulating effect on growth by slightly

increasing the biomass. It is not known whether this stimulating effect was due to higher levels of nutrients found in the cells. An I level of 10  $\mu\text{M}$  in medium was deleterious for the growth of cells. Studies done with labelled I showed that even after a 3h uptake period the cells contained only 0.17% of the total available iodine. The level of I determined in this study is much lower as compared with other experiments done using whole plants.

AsA in medium had no effect on biomass produced and the cell division rate. However, the dry weights, sucrose, glucose, fructose and citric acid contents were high in cells cultured with AsA in medium. Cells readily absorb AsA from medium. A rapid reduction in AsA contents in cells and in medium was observed and the reasons for such reductions are discussed.

A habituated cell suspension for auxins was obtained through a stepwise reduction in indole acetic acid concentration in medium. These cells produced almost the same biomass as cells grown either with only IAA, kinetin or both in medium. There were no significant differences in the number of embryos and plantlets produced between the control and habituated cells, suggesting that the totipotency of cells was not altered when the cells become autotrophic to IAA. The IAA analysis done using monoclonal antibodies showed, that the habituated cells produced more IAA than the control cells. Cell suspensions initiated using stem pieces from seedlings obtained from regenerated autotrophic cells, could not grow in a medium devoid of IAA. These results indicate that the process of habituation is epigenetic in nature and is not due to a mutation. Such changes are reversible and are not transmitted meiotically.

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss von Bor, Mangan, Iod und Ascorbinsäure auf das Wachstum von Tomatenzellen in Suspensionskulturen wurde untersucht.

In einem borfreien Medium ergab sich keine Zunahme der Zellbiomasse nach vier Tagen. Die höchste Biomasse wurde bei Borkonzentrationen im Medium von 0.09 und 0.55 mM gebildet. Sowohl bei niedrigen (0.005-0.007 mM) wie auch bei hohen (2.30-4.15 mM) Borkonzentrationen ergaben sich niedrige Zellbiomassen. Borkonzentrationen

von 1.85 mM und mehr im Medium wirkten toxisch. In Abhängigkeit von der Borkonzentration im Medium und der Einwirkungszeit wurden zwei Beobachtungen gemacht. Bei borverhungerten Zellen erfolgt die Aufnahme von Bor aus dem Medium innerhalb von wenigen Stunden. Dabei ergibt sich nahezu ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration im Medium und in der Zelle. Dieses Gleichgewicht wird durch metabolische Hemmstoffe nicht beeinflusst. Diese Resultate deuten daraufhin, dass Bor passiv aufgenommen wird. Ein sehr grosser Teil des aufgenommenen Bors konnte ausgewaschen werden und nur sehr kleine Mengen blieben in den Zellen zurück.

Trotz eines fünfzigfachen Unterschieds im Medium ergaben sich bei Konzentrationen von 0.002 oder 0.1 mM Mangan keine Unterschiede in der Biomasse oder Trockenmasse der Zellen. Ohne Mangan (Mangel) oder bei 0.2 mM Mangan (Toxizität) wurden nur niedrige Biomassen gebildet. Manganmangel bzw. Mangantoxizität verursachten starke Veränderungen in der Zellteilung wie auch in der Vitalität der Zellen. Die Zellen wiesen bei Mangankonzentrationen von 0.2 mM niedrige Gehalte an Zink, Kupfer und Eisen auf, während diese ohne Mangan im Medium erhöht waren.

Obschon die Biomasse oder das Trockengewicht nicht signifikant durch Iodkonzentrationen von 0, 5 oder 7.5  $\mu\text{M}$  im Medium erhöht wurden, ergab sich ein stimulierender Effekt auf das Wachstum. Es ist nicht bekannt, ob diese Stimulierung auf höhere in den Zellen gefundene Nährstoffkonzentrationen zurückzuführen ist. 10  $\mu\text{M}$  Iod im Medium wirkten sich schädlich auf das Wachstum der Zellen aus. Nach drei Stunden nahmen die Zellen nur 0.17 % des gesamten im Medium vorhandenen Iods auf. Die in Zellen bestimmten Iodkonzentrationen sind viel niedriger als bei ganzen Pflanzen gefunden wurde.

Ascorbinsäure im Medium beeinflusste weder die gebildete Biomasse noch die Zellteilungsrate. Jedoch waren das Trockengewicht, die Saccharose-, Glukose-, Fruktose- und Zitronensäuregehalte erhöht. Zellen nehmen Ascorbinsäure rasch aus dem Medium auf. Ascorbinsäure wurde rasch im Medium und in den Zellen reduziert. Die diesbezüglichen Gründe werden diskutiert.

Durch eine schrittweise Reduktion der Indolsäurekonzentration ergab sich eine Auxin autotrophe Zellsuspension. Diese Zellen produzierten beinahe dieselbe Biomasse wie

Zellen, die entweder mit Indolsäure oder Kinetin oder beidem im Medium kultiviert wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl Embryos oder Pflänzchen zwischen Kontrollverfahren und habituierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Totipotenz Indolsäure autotropher Zellen nicht geändert wurde. Indolsäureanalysen mit monoklonalen Antikörpern zeigten, dass habituierte Zellen mehr Indolsäure produzierten als Zellen von Kontrollverfahren. Zellsuspensionen, die aus Stengelstücken von Keimlingen regenerierter autotropher Zellen, initiiert wurden, konnten ohne Indolsäure nicht wachsen. Diese Resultate deuten daraufhin, dass der Prozess der Habituation epigenetisch ist und nicht auf eine Mutation zurückzuführen ist. Diese Änderungen sind umkehrbar und werden nicht meiotisch weitergegeben.