

P.2435  
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 21 1994**

Suplement nr 4

# Postępy Biologii Komórki

Redaktor Stefan Malepszy

## **Somatyczna embriogeneza**

i jej molekularno-genetyczne  
uwarunkowania u roślin



<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,  
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,  
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,  
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,  
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa*

---

# PROCES SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY – CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

## PROCESS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS – GENERAL CHARACTERISTICS

S. MALEPSZY, T. WRÓBLEWSKI

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie.* Somatyczna embriogeneza SE jest zjawiskiem ogólnobiologicznym, zachodzącym w kulturach *in vitro* komórek i tkanek roślin, zarówno na pożywkach płynnych jak i agarowych. Najbardziej charakterystyczne jest występowanie SE w kulturach płynnych. W ustalonej embriogenicznej kulturze zawieszinowej (UEKZ) można wyróżnić cykl auksynowy i bezauksynowy, a w nich cztery stany komórek i tyleż faz. Charakterystyczną cechą UEKZ jest występowanie proembriogenicznej masy (PEM). Częstość, z jaką zachodzi somatyczna embriogeneza, jest bardzo zmienna i zależy od wielu czynników endo- i egzogennych. Bardzo istotną rolę odgrywa genotyp. Stadia dojrzałe somatycznych zarodków często przypominają odpowiednie stadia zarodków zygotycznych, chociaż u wielu gatunków występują różnice dotyczące stopnia rozwoju liścieni, wielkości i in. Również czas potrzebny do uzyskania poszczególnych stadiów zarodków somatycznych (od momentu indukcji PEM) jest zwykle podobny do zarodków zygotycznych.

### 1. WSTĘP

Somatyczna embriogeneza (SE) jest procesem wytwarzania zarodków z komórek innych niż zygota. Ma ona dwie charakterystyczne cechy:

- (1) W układzie eksperymentalnym zachodzi głównie w kulturze *in vitro*.
- (2) Istnieje wiele analogii w przebiegu SE i zygotycznej embriogenezy (ZE).

SE jest procesem ogólnobiologicznym. W świecie roślin została opisana u jedno- i dwuliściennych, okryto- i nagozalążkowych, zielnych i drzewiastych. Jest to spowodowane tym, że w przeciwieństwie do innych *Eucaryota*, program różnicowania u



roślin jest plastyczny i w zasadzie każda żywa, zróżnicowana komórka może stać się embriogenną w określonych warunkach. Reinicjacja pełnego cyklu rozwojowego w SE musi być związana z przeprogramowaniem wzoru ekspresji genów w komórce i uruchomieniem kaskady zmian – podobnie jak w ZE. Zainteresowanie SE wynika głównie z dwóch powodów. Po pierwsze jest ona doskonałym modelem do badań nad embriogenezą w ogóle. Drugi powód jest praktyczny i wynika z tego, że tworzenie somatycznych zarodków jest formą rozmnażania wegetatywnego i może znaleźć zastosowanie w nasiennictwie i szkółkarstwie do produkcji materiału siewnego o wysokiej jakości. Technologię tę nazwano sztucznymi nasionami (*artificial seeds*, *synthetic seeds*) i była ona dyskutowana przez wielu autorów [7,11,16,17].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie ogólnych uwarunkowań SE, jako wprowadzenia do rozważań szczegółowych nad rolą poszczególnych czynników [20], jakością roślin [14] i charakterystyką genów [5] uczestniczących w SE.

## 2. TERMINOLOGIA

Z występowaniem i opisem somatycznej embriogenezy w kulturach *in vitro* wiąże się wiele określeń, z których najważniejsze zostaną przytoczone poniżej.

# **Agregat komórkowy** – jest to konglomerat złożony z dwóch lub więcej komórek, stanowiący oprócz pojedynczych komórek, podstawowy składnik zawiesin komórkowych. W embriogennych kulturach zawieszinowych niektóre z agregatów komórkowych mają charakter masy proembriogenicznej i po indukcji embriogenezy formują zarodki somatyczne.

# **Eeksplantat** – jest to fragment rośliny lub tkanka używana do zainicjowania kultury *in vitro*. W przypadku gdy pochodzi z rośliny, mówimy o eksplantacie pierwotnym określanym często jako *stadium inicjalne*. Jeżeli eksplantat pochodzi z kultury *in vitro* wcześniej założonej określanym jest jako wtórny. W przypadku indukcji kultur płynnych eksplantat utożsamiany jest z inokulumem.

# **Embrioidalna struktura** (embrioid) – oznacza merystematyczne struktury (o czym świadczy nieprzypadkowe uporządkowanie komórek w ich obrębie), które jednak nie wykazują wyraźnej biegunowości. Struktury embrioidalne mogą stanowić stadium przejściowe w trakcie formowania się zarodka somatycznego z tkanki nieróżnicowanej lub być efektem jego degeneracji.

# **Indukcja embriogeniczności** – jest to proces wyzwolenia, w pojedynczej komórce lub ich grupie, potencjału do formowania zarodka. W tkance zróżnicowanej związana jest z odróżnicowaniem i na ogół nadaniem komórkom merystematycznego charakteru. Przestrzenne zorientowanie płaszczyzn podziałów w tkance proembriogenicznej nigdy nie wykazuje znamion uporządkowania, gdyż te świadczą już o zachodzącej morfogenezie.

# **Indukcja embriogenezy** – jest to proces wyzwolenia z pojedynczej komórki lub ich grupy embriogenezy. Faza embriogeniczna tym różni się od proembriogenicznej, że podziały komórek zachodzą w sposób nieprzypadkowy i są przestrzennie zorientowane podobnie jak to ma miejsce w czasie pierwszych etapów formowania się zarodka zygotycznego. Indukcja embriogenezy na ogół ma miejsce po usunięciu z pożywki czynnika hamującego embriogenezę (np. auksyny lub po podwyższeniu pH).

# **Kultura zawieszinowa** (*suspension culture, cell suspension culture*) – zawieszina komórkowa, ale w odniesieniu do czasu. Kulturą zawieszinową jest zawieszina komórkowa, w której następują w czasie określone zmiany np. dyspersja, podziały itd. Dla kultur zawieszinowych założonych np. z kalusa, które w kolejnych pasażach nie powtarzają parametrów wzrostu, używa się określenia: krótkotrwałe kultury zawieszinowe (*short-term suspension culture*). Z reguły kultury takie cechuje bardzo duża różnorodność morfologii komórek i agregatów, które wchodzi w jej skład.

# **Masa proembriogeniczna – PEM** (od ang. *proembryogenic mass*) – kilkunaścio- i kilkudziesięciokomórkowe agregaty występujące w UEKZ, o wielkości z reguły nie przekraczającej 0,2 mm. Jeżeli agregat PEM zostanie zaindukowany do embriogenezy, to jedna lub więcej komórek wchodzących w jego skład zaczyna dzielić się w sposób zorganizowany, czego efektem jest powstanie zarodka somatycznego.

# **Pasaż** – przeniesienie całej kultury lub jej części na świeżą pożywkę.

# **Posiew** – rodzaj pasażu polegający na przeniesieniu całej kultury lub jej części (np. frakcji) na świeżą lub inną pożywkę. Od zwykłego pasażu różni się tym, że w czasie operacji tkanka zawieszona jest w płynnej pożywce.

# **Somatyczna embriogeneza SE** – proces morfogenetyczny, w wyniku którego z komórki lub komórek roślinnych (z wyłączeniem zygoty i gamet) powstanie struktura o morfologii zbliżonej lub identycznej z morfologią któregoś ze stadiów rozwojowych zarodka zygotycznego. (Wg definicji *Tissue Culture Association*, 1990 jest to proces zainicjowania i rozwoju zarodka z komórek wegetatywnych lub nie-gamet.)

# **Somatyczny zarodek** – struktura powstała w wyniku somatycznej embriogenezy wykazująca morfologiczne podobieństwa do zarodka zygotycznego; w praktyce mianem zarodków somatycznych są określane pojawiające się najczęściej w kulturach tkanek struktury mające wyraźną biegunowość, która w wyniku dalszego ich rozwoju odpowiada biegunowości pęd - korzeń rośliny. Kryterium obecności lub braku liścieni bądź ich primordiów nie jest tu decydujące.

# **Technika kultury *in vitro*** -- materiały i metodyka, którą należy zastosować w celu sterylnej uprawy tkanek lub komórek dla osiągnięcia zmian w ich zachowaniu lub utrzymaniu ich w określonym stanie.

# **Typ (rodzaj) kultury *in vitro*** – oznacza stan tkanki lub organów oraz warunki, w jakich zachowują się one w określony sposób.

# **Ustalona embriogeniczna kultura zawieszinowa – UEKZ** (*long-term embryogenic suspension culture*) – ustalona kultura zawieszinowa, w której kolejnych pasażach

powtarza się proces indukcji embriogenezy z małych agregatów i pojedynczych komórek, co objawia się pojawianiem charakterystycznych agregatów PEM oraz wczesnych stadiów rozwoju zarodków somatycznych. Ustalone embriogenne kultury zawiesinowe można otrzymywać także z nieembriogenicznych kultur ustalonych przez indukcję w nich embriogeniczności.

# **Ustalona kultura zawiesinowa – UKZ** – kultura zawiesinowa, która powtarza parametry wzrostu w kolejnych subkulturach. W literaturze angielskiej określana na ogół jako *long-term suspension culture*. Termin *long-term* wskazuje na długoterminowość takiej kultury, co oznaczałoby, że świeżo założonej kultury nie cechuje powtarzanie parametrów wzrostu w kolejnych pasażach i na ogół tak bywa (choć nie zawsze). W praktyce z reguły zachodzi zależność: w kolejnych następujących po sobie pasażach kultura wyrównuje się i każda kolejna subkultura coraz wierniej powtarza parametry wzrostu poprzedniej. Wyrównanie parametrów wzrostu wynika z zachowania równowagi pomiędzy dyspersją (rozpadaniem się agregatów na mniejsze i pojedyncze komórki) i podziałami (prowadzącymi do powstania większych agregatów z małych i pojedynczych komórek).

# **Zawiesina komórkowa (*cell suspension*)** – oznacza stan dyspersji, w którym w płynnym środowisku (najczęściej w pożywce) zawieszane są pojedyncze komórki i (lub) agregaty komórkowe (z reguły nie przekraczające wielkości 1 mm). Określenie zawiesina komórkowa nic nie mówi o zależnościach panujących w układzie, np. zdolności do wzrostu, potencjale morfogenetycznym itd.

### 3. WYSTĘPOWANIE SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Po to aby SE wystąpiła, muszą mieć miejsce przynajmniej dwa zdarzenia: indukcja embriogeniczności i indukcja embriogenezy, a jednocześnie nie mogą wystąpić warunki, które zakłóca jej przebieg. **Indukcja embriogeniczności** jest nabyciem przez komórkę lub grupę komórek kompetencji do embriogenezy. Różne części rośliny zachowują się bardzo różnie, jeśli chodzi o indukcję embriogeniczności. Niektóre zawierają zawsze znaczną liczbę kompetentnych komórek, inne nie zawierają ich wcale. Mówimy wtedy o różnej zdolności do somatycznej embriogenezy lub ogólniej o różnej zdolności do regeneracji. Embriogenezę uzyskiwano z różnego rodzaju eksplantatów [15]. W piśmiennictwie polskim ostatnią (1990) pracą przeglądową dotyczącą SE była publikacja Kononowicz [10].

Obecnie przyjmuje się, że somatyczne zarodki można uzyskiwać z każdego eksplantatu zawierającego żywe, zdolne do podziałów komórki. Embriogeniczność objawiająca się tworzeniem zarodków może być zaindukowana bezpośrednio w eksplantacie lub też w tkance z niego powstałej. W tym drugim przypadku często dzieje się to w wyniku kolejnych subkultur tkanki, także na takiej samej pożywce.

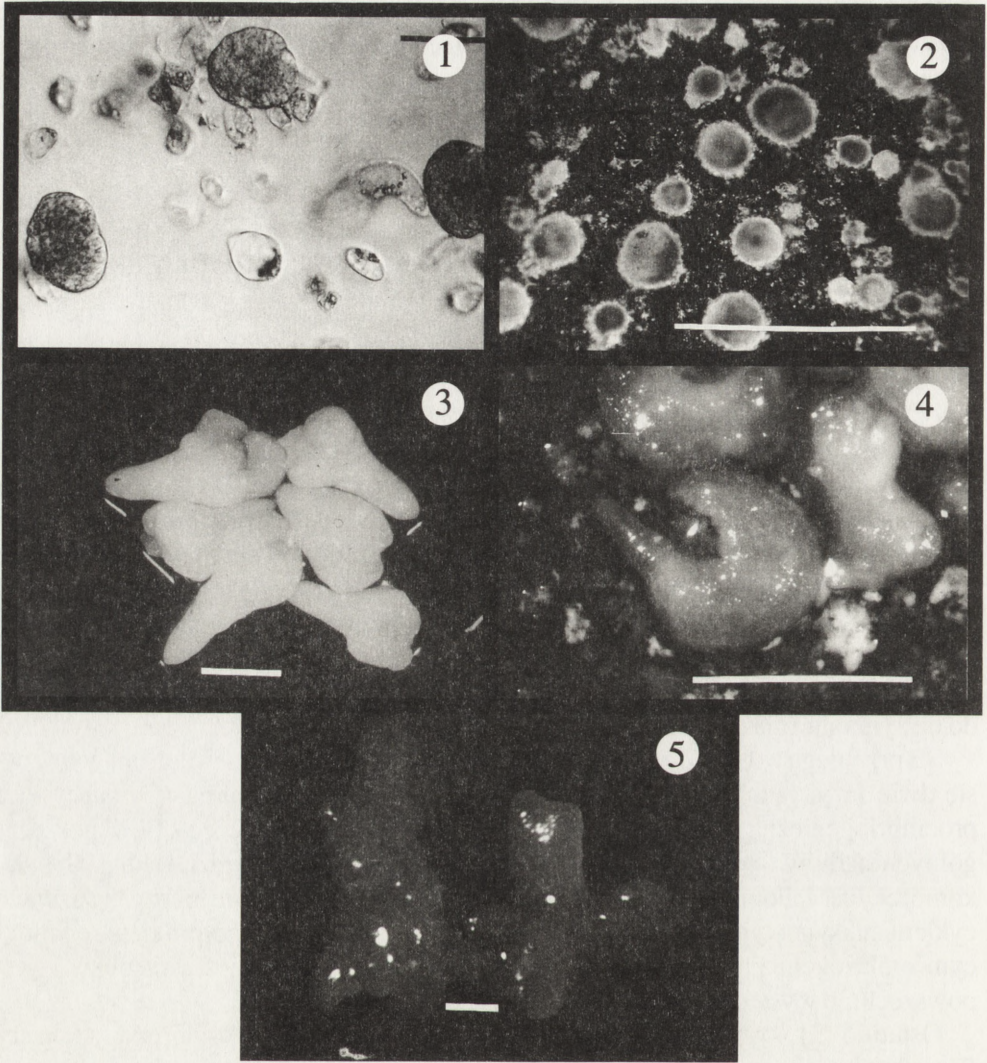
Czynniki decydujące o zajściu SE tkwią więc w samym eksplantacie oraz składzie pożywki i warunkach kultury. Znaczenie dwóch ostatnich zestawień dokładniej jest omówione w innej publikacji [20]. Ogólnie SE zachodzi na pożywkach stałych (zestalonych agarom) oraz płynnych. W niniejszym opracowaniu zostaną przytoczone dane dotyczące wyłącznie kultur płynnych.

#### 4. CHARAKTERYSTYKA SE W KULTURZE PŁYNNEJ

SE w kulturze płynnej może być widoczna makroskopowo jako tworzenie zaczątków roślin na eksplantacie lub występowanie poza eksplantatem różnych faz rozwojowych somatycznych zarodków. Ten pierwszy efekt jest wynikiem indukcji embriogeniczności i embriogenezy w komórkach eksplantatu oraz niezakłóconego rozwoju zarodków w wyniku tzw. bezpośredniej somatycznej embriogenezy. Natomiast drugi powstaje w wyniku przejścia komórek embriogennych do roztworu lub nabycia takiej kompetencji przez komórki oderwane od eksplantatu. W obu przypadkach mamy do czynienia z kulturą embriogenną. Różnica pomiędzy dwiema wyżej przedstawionymi sytuacjami polega na tym, że po wyjęciu eksplantatów z pierwszej z nich pozostała część nie wytworzy somatycznych zarodków. Natomiast w drugiej część kultury można użyć do ciągłego powtarzania efektu. Takie postępowanie może doprowadzić do otrzymania UEKZ.

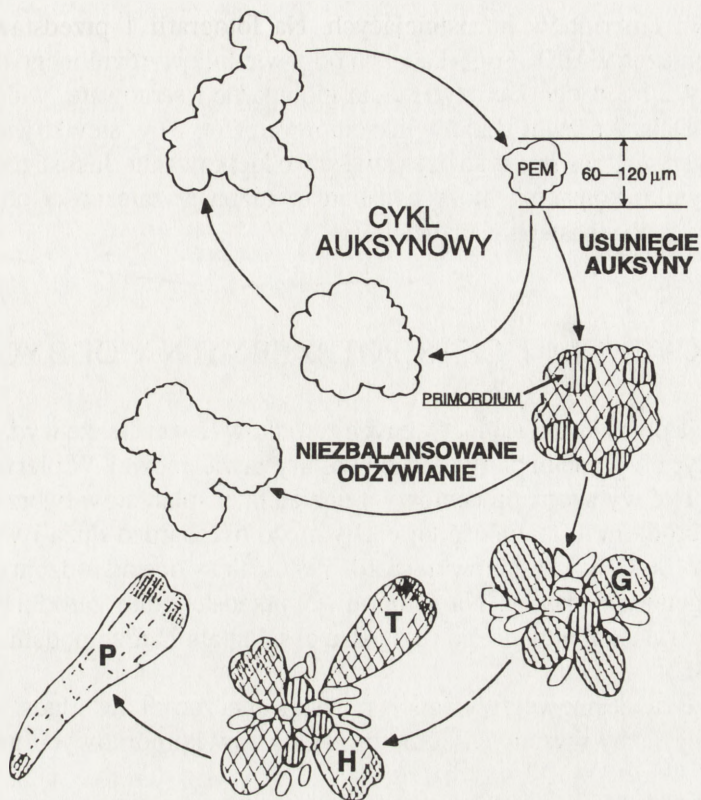
SE przebiega w UEKZ zgodnie z pewnym schematem (rys. 1), w którym wyróżnia się dwie fazy. Jedną to charakterystyczne niezorganizowane agregaty zwane masą proembriogeniczną – PEM (fot. 1) i druga obejmująca tworzenie się z PEM poszczególnych stadiów zarodka (fot. 1–4). W tworzeniu zarodka bierze udział jedna lub kilka komórek PEM. Ponieważ PEM utrzymuje się w obecności auksyn, to fazę tę nazwano cyklem auksynowym. Nie oznacza to, że auksyna jest jedynym czynnikiem regulującym embriogeniczność. Przyjmuje się, że cykl przedstawiony na rysunku 1 jest powszechnie występującym w UEKZ większości roślin.

Ostatnio [9] wyróżniono u marchwi trzy specyficzne stany komórek oraz cztery fazy dla obydwu cykli (rys. 2). Typowymi dla cyklu auksynowego są komórki stanu 0 i fazy 0 oraz stanu I. Pierwsze z nich to kompetentne pojedyncze komórki, które w obecności auksyny tworzą embriogenne agregaty komórkowe, czyli stan I. Po usunięciu auksyny agregaty te powoli namnażają i powiększają się, pozostając niezróżnicowane – faza I, po czym następują szybkie podziały komórkowe prowadzące do uformowania się globularnych zarodków – faza II. Te ostatnie przechodzą w stadium sercowate i torpeda, a dalej w rośliny – faza III. Komórki stanu 0 i fazy 0 wyróżnione zostały u marchwi jako *Komórki Specyficznego Typu 1*. Różniły się od pozostałych wielkością (były mniejsze) i gęstością, co umożliwiło ich izolację przez wirowanie w gradiencie fikolu [13]. Tworzeniu zarodków w UEKZ często towarzyszy wtórna embriogeneza. W jej wyniku powstają zarodki przybyszowe z pędowych i hypokoty-

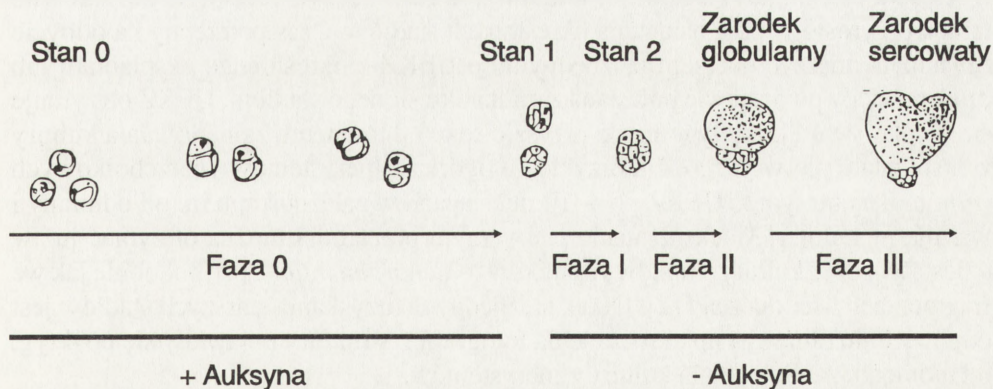


**Fot. 1.** Agregaty PEM w ustalonej kulturze zawiesinowej ogórka (podziałka = 0.1 mm). **Fot. 2.** Somaticzne zarodki ogórka, z ustalonej kultury zawiesinowej, w stadiach: globularnym i sercowym (podziałka = 1 mm). **Fot. 3.** Somaticzne zarodki ogórka, z ustalonej kultury zawiesinowej, w stadium dojrzałym. Widoczne zredukowane liścienie (podziałka = 1 mm). **Fot. 4.** Somaticzne zarodki ogórka z posiewu zawiesiny typu *short-term*. Widoczne znaczne zróżnicowanie w rozwoju, w tym stadia liścieniowe (podziałka = 1 cm). **Fot. 5.** Zarodki somatyczne ogórka w stadiach sercowatym i torpeda powstałe w wyniku bezpośredniej somatycznej embriogenezy z merystemu apikalnego pobranego z siewki (podziałka = 1 mm)





Rys. 1. Wzrost i różnicowanie w kulturach komórkowych marchwi; tkanka namnażana jest przy ciągłej presji auksyny, powstają w niej primordia – pierwsze stadia rozwojowe zarodków, usunięcie auksyny powoduje ich dalszy rozwój: PEM – masa proembryogeniczna, G – stadium globularne zarodka, H – stadium sercowate zarodka, T – stadium torpedy, T – zarodek dojrzały (wg Wetherell 1978 za [2])



Rys. 2. Fazy rozwojowe w somatycznej embriogenezie obserwowane w kulturach marchwi [wg 9]

lowych części embrionów już istniejących. Na fotografii 1 przedstawiono masę proembriogeniczną w UEKZ ogórka, czyli odpowiednik wyróżnionego dla marchwi stanu 1. Fazy 2 i 3 u ogórka, czyli stadia globularne i sercowate, widoczne są na fotografii 2. Dalszy rozwój stadiów liścieniowych (fot. 3) w siewki jest nazywany zwykle *konwersją w rośliny*, rzadziej mówi się o kiełkowaniu. Jakość roślin powstających w wyniku konwersji może być bardzo różna w zależności od warunków kultury, konwersji, a następnie adaptacji.

## 5. FREKWENCJA I CZAS POTRZEBNY NA ODBYCIE SE

Frekwencja powstawania somatycznych zarodków (zwana także wydajnością SE) może dotyczyć eksplantatu pierwotnego i kultury zawiesinowej. W pierwszym przypadku może być wyrażona procentowym udziałem eksplantatów tworzących jeden lub więcej zarodków. Zmienność tej cechy może być bardzo duża i wahać się od ułamka % do 100%, najczęściej wynosi 20–50%. Zależy ona od rodzaju eksplantatu, a także od genotypu dawcy. Na fotografii 5 przedstawiono zarodki somatyczne powstałe z merystemu apikalnego (u ogórka eksplantatu bardzo podatnego na zaindukowanie SE).

W kulturze zawiesinowej frekwencję powstawania zarodków odnosi się do:

(1) ogólnej liczby wysianych komórek, agregatów komórkowych lub jednych i drugich,

(2) określonej objętości kultury podstawowej, z której dokonywany jest posiew.

Uzyskiwane wydajności są bardzo zróżnicowane w zależności od gatunku, odmiany, warunków kultury, a nawet laboratorium. Na przykład najwyższe wartości ustalonej embriogenicznej kultury marchwi wynoszą 60 zarodków z 1 ml zawiesiny użytej do posiewu [1]. Z 1 ml analogicznej zawiesiny u ogórka uzyskano 21 zarodków [21].

Generalnie, zmiany zachodzące w kulturze *in vitro* są szybkie. Dotyczy to zarówno tempa przyrostów, jak i osiągnięcia określonych stadiów. Czas potrzebny na odbycie SE można mierzyć okresem niezbędnym do UEKZ z określonego eksplantatu lub czasem, kiedy po posiewie powstaną zarodki określonego stadium. UEKZ otrzymuje się po okresie od kilku tygodni do przeszło roku od momentu zainicjowania kultury z eksplantatu pierwotnego. Na przykład u ogórka z merystemów wierzchołkowych pędu można otrzymać UEKZ po 4–10 miesiącach w zależności m.in. od odmiany i warunków kultury. W eksplantacie pierwotnym prazarodki można otrzymać już w dziesiątym dniu kultury słupków i pylników u *Cichorium intibus* [4], podobnie jak we fragmentach liści ogórka [12]. Okres niezbędny do uzyskania starszych stadiów jest odpowiednio dłuższy i np. pokazane na fotografii 5 struktury pojawiały się po 4 tyg. od momentu zainicjowania kultury z merystemów.

W UEKZ ogórka zarodki globularne pojawiają się po tym samym mniej więcej czasie (12 dni po posiewie na pożywkę bez auksyny), jaki jest potrzebny do powstania

analogicznego stadium zarodka zygotycznego [18]. Widoczne na fotografii 4 stadia liścieniowe rozwinęły się po 21 dniach od momentu posiewu UEKZ na pożywkę wolną od regulatorów wzrostu.

## 6. EMBRIOGENEZA *IN VITRO* I *IN VIVO*

Pytanie o podobieństwo pomiędzy somatyczną embriogenezą a zygotyczną intryguje badaczy w zasadzie od chwili odkrycia SE. Porównania obu tych procesów dotyczą przeróżnych aspektów, najczęściej morfologicznej zgodności stadiów (SE i ZE) i charakterystycznych białek lub mRNA, a znacznie rzadziej obecności substancji charakterystycznych dla poszczególnych faz rozwojowych zarodka. Somatyczne zarodki rzepaku syntetyzowały specyficzne białka zapasowe nasion [6] i kruciferynę. Z kolei u lucerny stwierdzono różnice w materiałach zapasowych SE i ZE [8], a u soi w zawartości tłuszczów [3]. Pod względem morfologicznym zarodki somatyczne mogą do złudzenia przypominać zygotyczne np. marchew, lucerna, seler, rzepak, świerk [19]. Natomiast somatyczne zarodki ogórka przypominają zygotyczne do stadium sercowatego. Starsze stadia są odmienne i zasadnicza różnica polega na występowaniu w nich takich nienormalności, jak: niedorozwój lub wytwarzanie wielu liścieni i brak plumuli [18, 21]. Ponadto różnice te mogą dotyczyć wielkości. U ogórka mogą występować zarodki globularne i sercowate bardzo odbiegające rozmiarami od zygotycznych [18]. Takie zmiany są charakterystyczne dla większości przebadanych gatunków.

Kolejne porównanie somatycznej i zygotycznej embriogenezy dotyczy czasu potrzebnego do powstania obu rodzajów zarodków. Właściwie dokładnych danych porównawczych nie przedstawiono w literaturze, a nasze wstępne obserwacje dotyczące ogórka wskazują, że czas potrzebny do uzyskania dojrzałego stadium zarodka ogórka *in vitro* i *in vivo* jest podobny [18].

Stabilność genetyczna jest kolejną ważną cechą w porównywaniu zarodków somatycznych z zygotycznymi. Dotyczy ona zarówno liczby i struktury chromosomów, jak i genów. Regeneracji w kulturach *in vitro* w ogóle (nie tylko SE) towarzyszy zjawisko somaklonalnej zmienności polegające na tym, że część roślin zregenerowanych lub ich potomstwa ma zmienione właściwości w porównaniu do roślin z nasion.

## LITERATURA

- [1] AMMIRATO P V. Organisational events during somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Cell Cult* 1987: 57–81.
- [2] BHOJWANIS S, RAZADAN M K. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B.V. 1983: 159–180.

- [3] DAHMER ML, COLLINS GB, HILDERBRAND DF. Lipid composition of soybean somatic embryos. *Crop Sci* 1991; **31**: 741–746.
- [4] DUBOIS T, DUBOIS J, BOURIGUET R. Somatic embryogenesis initiated by anthers and styles of *Cichorium*. [w:] *Some Aspects and Actual Orientation in Plant Embryology*. Pare J, Bognicourt M (eds). Piceardie Press, Amiens, France; 1989: 158–166.
- [5] FILIPECKI M, WROBLEWSKI T, MALEPSZY S. Regulacja aktywności genów podczas embriogenezy u roślin. *Post Biol Kom* 1994; **supl. 4**:
- [6] FINKELSTEIN R R, TENBARGE K M, SHUMAWAY J E, CROUCH M L. Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol* 1985; **78**: 630–636.
- [7] FUJI J, SLADE D, RADENBAUGH K, WALKER K. Artificial seeds for plant propagation. *Trends in Biotech* 1987; **5**: 335–339.
- [8] FUJI J, SLADE D, RADENBAUGH K. Maturation and greenhouse planting of artificial seed. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; **25**: 1179–1182.
- [9] KOMMAMINE A, MATSUMOTO M, TSUKAHARA M, FUJIWARA A, KAWAHARA R, ITO M, SMITH J, NOMURA K, FUJIMURA T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures - physiology, biochemistry and molecular biology. [w:] *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Proceed VII Intern Congerss on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam 24–29 June 1990*, Nij Kamp H J J, Van Der Plas L H W, Van Artijk J, Kluwer Acad Publ: 307–313.
- [10] KONONOWICZ H. Embriogeneza roślin *in vitro*. *Biotechnologia* 1990; **2–3**: 52–59.
- [11] MALEPSZY S. Sztuczne nasiona – Przełom w masiennictwie. *Post Nauk Rol* 1988; **4**: 3–15.
- [12] NADOLSKA-ORCZYK A, MALEPSZY S. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. VI. Histological analysis of leaf explants cultured on media with 2,4-D or 2,4,5-T. *Acta Soc Bot Pol* 1987; **56(1)**: 55–60.
- [13] NOMURA K, KOMMAMINE A. Identification and Isolation of Single Cells that Produce Somatic Embryos at a High Frequency in a Carrot Suspension Culture. *Plant Physiol* 1985; **79**: 98–991.
- [14] PRZYBECKI Z. Rośliny powstałe w wyniku somatycznej embriogenezy. *Post Biol Kom* 1994; **supl. 4**: 49–55.
- [15] RAGHAVAN V. Embryogenesis in Angiosperms. A Developmental and Experimental Study. Cambridge University Press 1986.
- [16] REDENBAUGH K, FUJI J A, SLADE D. Synthetic Seed Technology. [w:] *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press Inc 1991; **6**: 35–74.
- [17] REDEDENBAUGH K, NICHOL J, KOSSLER M E, PASCH B. Encapsulation of somatic embryos for artificial seeds production. *In Vitro* 1984; **20(3)**: 256–257.
- [18] TARKOWSKA J A, BRZOSTECKA D, BURZA W, MALEPSZY S. Cytohistological analysis of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) I. Comparison of cell suspension containing and lacking natural fluorescence with *in vivo* developing embryos. *Acta Soc Bot Pol* 1994 (w druku).
- [19] WANN S R. Somatic embryogenesis in woody species. *Horticultural Rev* 1989; **35**: 153–180.
- [20] WRÓBLEWSKI T. Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka szczegółowa. *Post Biol Kom* 1994; **supl. 4**: 11–31.
- [21] WRÓBLEWSKI T, MALEPSZY S. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVI. Established long-term culture. Fifth EUCARPIA *Cucurbitaceae* Symposium 1992: 104–107.

S. Malepszy, T. Wróblewski  
02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166

# PROCES SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY – CHARAKTERYSTYKA SZCZEGÓŁOWA

## PROCESS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS – DETAILED CHARACTERISTICS

Tadeusz A. WRÓBLEWSKI

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych SGGW w Warszawie

*Streszczenie.* Badania nad somatyczną embriogenezą najdalej są posunięte u marchwi, która w kulturach *in vitro* jest rośliną modelową. Określono wiele czynników, które wpływają na formowanie się zarodków somatycznych. Najwięcej uwagi poświęcono składnikom pożywki oraz jej pH. Do otrzymywania kultur embriogennych u większości roślin najczęściej używanym czynnikiem hormonalnym jest syntetyczny analog auksyny – 2,4-D, jakkolwiek może on być zastępowany przez niskie pH pożywki. Techniki cytologiczne przyczyniły się także do lepszego poznania fenomenu rozwoju zarodków poza ustrojem rośliny. Okazuje się, że wiele zjawisk zachodzących w embriogennych kulturach zawieszinowych ogórka zachodzi w sposób bardzo podobny, jak to ma miejsce u modelowej marchwi. Dokładne poznanie somatycznej embriogenezy od strony morfogenetycznej, cytologicznej i biochemicznej stwarza dobre podstawy do badań molekularnych tego zagadnienia. Doskonalenie technik sterowania rozwojem zarodków somatycznych umożliwiwa praktyczne wykorzystanie zjawiska w biotechnologii produkcji somatycznych nasion.

## 1. WPROWADZENIE

Podstawą zachowania ciągłości gatunków zarówno u roślin, jak i zwierząt było wytworzenie mechanizmów odtwarzania nowych osobników. Mechanizmy te są tym bardziej skomplikowane, im bardziej skomplikowany jest organizm, któremu dają początek. Pierwszym etapem ontogenezy jest embriogeneza. Zachodzi ona często w ścisłej korelacji z organizmem matecznym. U zwierząt zarodek powstaje z reguły z jednej komórki – zygoty. U roślin właściwości zygoty mają także niektóre komórki somatyczne. Rozwijające się z nich zarodki nie są więc zarodkami zygotycznymi tylko somatycznymi. Badania nad naturą tego zjawiska są jedną z podstawowych gałęzi

nauki określanej jako embriologia eksperymentalna roślin. Podstawowym narzędziem tej nauki są kultury *in vitro* komórek, tkanek i organów roślinnych. Najlepiej poznaną rośliną modelową jest marchew [40]. U gatunku tego łatwo jest zaindukować powstawanie zarodków w kulturze *in vitro*, a tym samym marchew stanowi dogodny model do badania czynników wpływających na embriogenezę w kulturach tkankowych. W Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych na SGGW podobne badania prowadzone są na ogórku.

Zaburzone warunkami kultury *in vitro* procesy cytodyferencjacji prowadzą do zjawisk nienormalnych. Pęd może rosnąć bez korzenia, korzeń natomiast bez pędu. W roślinie rosnącej bez zakłóceń cytodyferencjacja jest skorelowana z histo- i organogenezą.

Określona komórka merystemu wierzchołkowego przechodząc kolejne podziały staje się elementem pramiazgi, a potem dalej różnicuje tworząc np. element trachealny młodej łodygi. Kultury *in vitro* i działające w nich czynniki doprowadzają do rozprzęgania tych wzajemnych zależności. Komórka może stać się elementem trachealnym, ale niekoniecznie musi znajdować się w łodydze lub liściu. Podobnie w przypadku somatycznej embriogenezy, komórka nie musi być zygota, aby w wyniku kolejnych podziałów uformować zarodek; niekoniecznie także musi znajdować się w woreczku zalążkowym. Tak więc, kultury *in vitro* stwarzają możliwość stymulacji różnych procesów bez związanych z nimi przemian, które w normalnych warunkach są ze sobą ściśle powiązane. Roślina jest mozaiką organów, tkanek, komórek. Komórka jest przypisana tkance, tkanka organowi.

Każda komórka budująca ciało rośliny pełni określoną funkcję. Uruchomiona jest w niej pewna informacja. Informacja ta pozwala komórce z jednej strony odbierać bodźce zewnętrzne, a z drugiej strony reagować na nie. Bodźce zewnętrzne to czynniki środowiskowe oraz, a może przede wszystkim, bodźce docierające z komórek sąsiednich. Komórka merystematyczna podzieli się (i do tego w odpowiedniej płaszczyźnie), ale tylko wtedy gdy będzie to zgodne z morfogenetycznym planem organu, czyli rozmieszczeniem komórek sąsiadujących. Kompetencje komórek do odbierania bodźców i reakcji na nie są niewątpliwie różne i niewątpliwie także pozostają w ścisłym związku z cytodyferencjacją.

Dysponując w kulturze *in vitro* mozaiką komórek odmiennie zróżnicowanych, mamy tym samym do czynienia z mozaiką kompetencji. Nie znaczy to oczywiście, że w każdej tkance uprawianej w warunkach sztucznych spotykamy się z całym spektrum kompetencji i reakcji morfogenetycznych. Co więcej, najbardziej poszukiwanymi modelami doświadczalnymi są komórki i tkanki w miarę możliwości jednolite. Układy takie stwarzają możliwości dokładnego śledzenia wielu procesów fizjologicznych i morfogenetycznych. Stanowią także modele do badań molekularnych.

## 2. DYNAMIKA PRZEMIAN W KULTURACH TKANEK *IN VITRO*

Elementem charakteryzującym wzrost rośliny, organu lub tkanki uprawianej *in vitro* jest dynamika. Innymi słowami następstwo przemian zachodzących na poziomie komórek, tkanek i organów w czasie. Tempo wzrostu rośliny, przyrostów suchej masy, podziałów i różnicowania komórek odnoszone są do czasu, w jakim te zmiany nastąpiły. W ten sposób opisany proces jest dynamiczny. Pozwala także przewidywać zachodzenie określonych zjawisk i w ten sposób zyskiwać chyba najistotniejsze informacje o ich naturze, a także wykorzystywać je w praktyce.

Obserwowane w kulturach *in vitro* zmiany w organizacji komórek są na ogół procesami szybkimi. Z reguły zachodzą w czasie kilku, kilkunastu dni trwania kultury. Są oczywiście procesy skrajnie zachodzące w przeciągu kilku minut lub godzin, a także rozciągnięte na kilka lub kilkanaście miesięcy. Jeżeli kultura tkanki prowadzona jest na pożywcze bez fosforanów (tzw. głód fosforanowy), podziały komórkowe są zahamowane. Dodanie do podłoża brakującego czynnika wyzwala je synchronicznie w krótkim czasie. Funkcjonowanie ustalonych, embriogennych kultur zawieszinowych związane jest z długotrwałym utrzymywaniem tkanki w kulturze *in vitro* (np. przez 10 miesięcy). Formowanie się somatycznego zarodka w kulturach tkankowych zachodzi w ciągu kilkunastu dni.

## 3. KOMPETENCJA KOMÓRKOWA W INDUKCJI EMBRIOGENICZNOŚCI

W roślinie rozwijającej się *in vivo* tylko zygota jest kompetentna do tego, aby w wyniku podziałów utworzyć zarodek. U niektórych roślin tę drogę rozwoju podejmują także komórki ośrodka (tzw. poliembryonia rzekoma u *Citrus* [34]). W warunkach kultury *in vitro* embriogeniczność wyzwalana jest w komórkach somatycznych i dzięki temu zdolne są one uformować zarodek. Ekspresja informacji genetycznej i epigenetycznej ulega w takich komórkach drastycznej zmianie – komórka odróżnicowuje i w ten sposób ujawnia się jej omnipotencja. Somatyczna embriogeneza jest zatem możliwa po spełnieniu dwóch warunków. Po pierwsze komórka lub ich grupa musi być kompetentna, a po drugie sama embriogeneza nie może być przez nic zakłócona. Komórki proembriogeniczne (zdolne do tego aby stać się embriogennymi) mają często różną morfologię [9]. Jeżeli wchodzi w skład eksplantatu pierwotnego są często elementami budującymi takie tkanki, jak: merystemy, młody miękisz lub młoda epiderma [47]. W kulturach tkankowych (a szczególnie w zawieszinie komórkowej potencjalnie embriogenne komórki) cechują się dużą aktywnością podziałową. (Komórki takie zostały u marchwi wyizolowane i określone jako Specyficznego Typu 1 [31]) W odróżnieniu od komórek embriogennych mogą być bardziej zwakuolizowane, z wyraźnie widocznymi plastydami. W eksplantacie pierwotnym zaindukowa-

nie embriogeniczności w komórkach proembriogennych wiąże się z po- budzeniem aktywności podziałowej (nie znaczy to bynajmniej, że jest to wystarczające).

Indukcja embriogeniczności w zawieszynie często łączy się z nierównocennym podziałem komórki preproembriogennej. Nierównocенność ta objawia się tym, że komórki potomne różnią się wielkością, kształtem i zawartością. Powstająca z komórki proembriogennej komórka embriogenna jest z reguły mniejsza, bardziej izodiametryczna, bogatsza w cytoplazmę. Nierzadko przyjmuje kształt grubej soczewki [11]. Powstawanie takich komórek często związane jest ze śmiercią komórki macecznej (proembriogennej), co objawia się obkurczeniem cytoplazmy [31]. Komórki embriogenne dzielą się w sposób niezorganizowany i w wyniku tych podziałów w zawieszynie powstają agregaty masy proembriogenicznej (PEM od ang. *proembryogenic mass*) [19]. Dopiero z takich agregatów po zaindukowaniu mogą powstawać zarodki somatyczne [9].

Stymulowane jonami amonowymi przejście od nieembriogeniczności układu do jego embriogeniczności zostało wykazane już przez Halperina w 1966 r. [19]. Kultury embriogenne tym różniły się od kultur nieembriogennych, że można było obserwować wspomniane agregaty PEM. Po indukcji (usunięcie auksyny – 2,4-D) jedna lub kilka komórek budujących agregat formowało zarodek. Krytyczną, minimalną ilością jonów amonowych niezbędną do zainicjowania w kulturach zawieszinowych marchwi embriogeniczności były 3 mmole na 1 kg proliferującej tkanki [41].

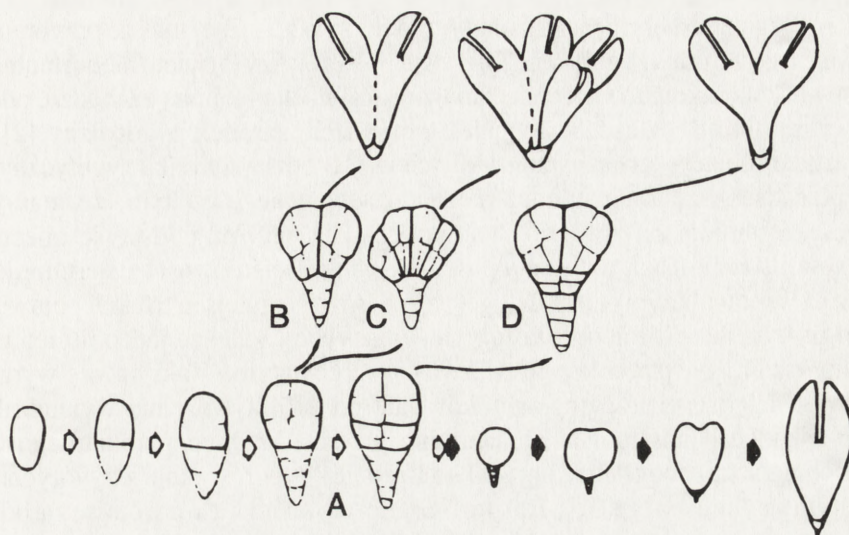
Okazało się jednak, że obecność w pożywce egzogennej auksyny (zgodnie z modelem cyklu auksynowego [4]) nie jest niezbędna do utrzymywania embriogennej tkanki w fazie niezróżnicowanej. Dowiódł tego system sterowania somatyczną embriogenezą opracowany dla modelowej marchwi. Czynnikiem, którego presji poddawane były tkanki, a który hamował różnicowanie, było niskie pH. W jego obecności następowało namnażanie się proembriogennej tkanki – preglobularnych stadiów proembrionów (PGSP od ang. *preglobular stages proembryos*) [37, 38, 39]. Tkanka ta reagowała wytwarzaniem zarodków na podłożu z ustabilizowanym wyższym pH. Nigdzie nie dowiedziono jednak, że dodatek do pożywki auksyny czy utrzymywanie niskiego pH jest kluczowym determinantem embriogeniczności.

O tym, że nastąpiła inicjacja embriogeniczności, można się dowiedzieć na ogół *post factum* – zaszła somatyczna embriogeneza, a więc komórki, z których uformował się zarodek, były embriogenne.

#### 4. EMBRIOGENEZA SOMATYCZNA A EMBRIOGENEZA ZYGOTYCZNA

Pierwszym pytaniem, które pojawia się przy rozpatrywaniu tych dwóch zjawisk, jest kwestia, co te procesy łączy, a co dzieli. Okazuje się, że postawienie w wielu



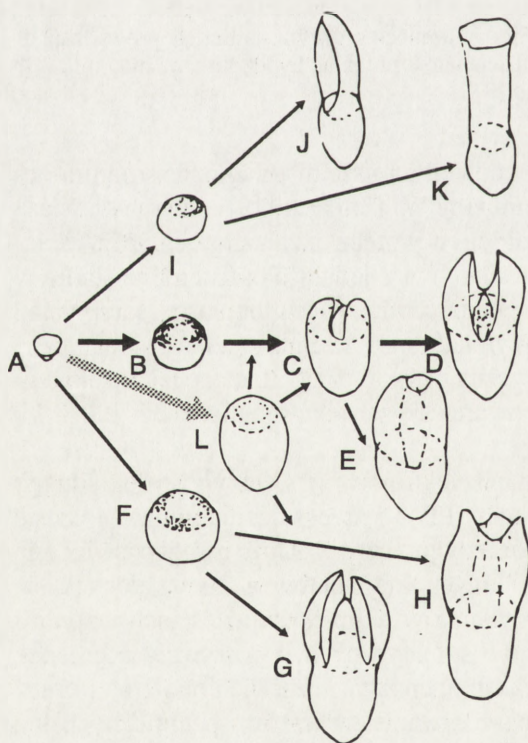


Rys. 1. Wczesne stadia rozwojowe zarodków somatycznych: (A) Droga rozwojowa zarodka somatycznego, w czasie której występują wszystkie stadia. (B) Dodatkowe podziały w zarodku przed zainicjowaniem plumuli i liścieni powodują powstania dwóch centrów wzrostu, co doprowadza w efekcie do rozwoju dwóch kompletnych zarodków połączonych u podstawy. (C) Więcej niż dwa centra prowadzą do powstania konglomeratu zarodków. (D) Dodatkowe podziały ko mórek i wydłużanie się regionu apikalnego mogące zachodzić w nieco starszym stadium doprowadzają do powstawania dwóch zarodków z rozwiniętymi liścieniami, plumulą, hypokotylem i rądkulą (za [3])

przypadkach jednoznacznej granicy jest trudne. Pierwsze histologiczne studium porównujące te zjawiska przedstawił wspomniany W. Halperin [19] u marchwi. Masę proembriogeniczną porównał z wieszadełkiem w woreczku zalążkowym. PEM składał się z kilku komórek – wieszadełko u marchwi z jednej. Poszczególne stadia w embriogenezie somatycznej i zygotycznej u marchwi, a więc globularne, sercowate i torpeda odpowiadały sobie wzajemnie. Wynika z tego, że embriogeneza somatyczna może zachodzić w sposób niemalże identyczny z zygotyczną. Zbadano także sekwencję zdarzeń zachodzących w czasie formowania się zarodka somatycznego z PEM u marchwi [13, 42].

Techniki cytologiczne (w tym mikroskopii elektronowej) posłużyły do dokładnego zdefiniowania komórek budujących agregaty PEM i prześledzenia zmian w czasie formowania się zarodków somatycznych oraz zygotycznych. Dużo uwagi poświęcono także specyficznemu wybarwianiu określonych fragmentów w rozwijających się zarodkach, a także możliwości umiejscowiania w różnych ich częściach wapnia i kalmoduliny [42]. Różne części zarodków somatycznych wykazywały odmienne powinowactwo do takich barwników, jak: fluphenazyne, czerwień obojętna i oranż akrydynowy. Reakcja taka umożliwia poszukiwanie związków specyficznych dla tych fragmentów.

Pomimo tego że embriogeneza somatyczna może w znacznej mierze przypominać formowanie się zarodka zygotycznego, z reguły towarzyszy jej wiele nienormalności. U marchwi sklasyfikowano je i wskazano, na którym etapie mogą zachodzić odchylenia w rozwoju od wzorca, którym jest oczywiście zarodek zygotyczny [2]. Na przykład determinacja zawiązywania się liścieni zachodzi w zarodku zygotycznym w czasie przejścia ze stadium globularnego do sercowatego. O tym, że mamy do czynienia ze stadium sercowatym, wnioskujemy na ogół na podstawie obecności zawiązków liścieni. Taka nienormalność, jak wieloliścieniowość, determinuje się również na wspomnianym etapie ontogenezy *in vitro*. Na miejscu liścieni pojawia się czasami tzw. trąbka. (Liścienie zrastają się, a niewykluczone, że jeden liścień przybiera taki kształt, jak płatki korony w kwiecie rurkowatym.) Taki proces wyraźnie obniżał potencjał regeneracyjny zarodków, ale go definitywnie nie wykluczał. W wielu przypadkach następował nienaturalny przerost stadium globularnego (taki zarodek somatyczny mógł mieć np. 500  $\mu\text{m}$  średnicy w porównaniu z zygotycznym, który w tym stadium ma tylko ok. 100  $\mu\text{m}$ ). Graficznie anomalie rozwojowe zarodków somatycznych oraz momenty, w których mają one miejsce, przedstawiono na rysunkach 1 i 2.



Rys. 2. Anomalie w rozwoju zarodków somatycznych na skutek zmian zachodzących w części apikalnej zarodków i podziałami komórek po zainicjowaniu primordiów liścieni. W czasie normalnego rozwoju zarodka w proembryonie (A) wyróżnicowuje się apikalna część (B), z której rozwijają się dwa primordia dające w efekcie dwa oddzielne liścienie (C). Między liścieniami w dojrzałym zarodku zakłada się merystem zarodkowy, czyli plumula (D). Kontynuacja podziałów komórkowych pomiędzy dwoma primordiami doprowadza do zrastania się dwóch liścieni. Zbyt intensywne podziały komórkowe w proembryonie doprowadzają do przerostu części apikalnej (F), w wyniku czego na dalszych etapach rozwoju zarodka powstaje kilka liścieni (G), które również mogą się zrastać (H). Jeżeli zbyt mało komórek proembryonu dzieli się, to z części apikalnej zarodka globularnego (I) wyróżnicowuje się tylko jedno primordium liścieniowe i powstaje jeden liścień, który również może się zrosnąć (K). Przedwczesna wakuolizacja (L) połączona (lub nie) z podziałami komórek doprowadza do nadmiernego rozrostu części plumularnej (za [3])

## 5. EGZOGENNE CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA SOMATYCZNĄ EMBRIOGENEZĘ

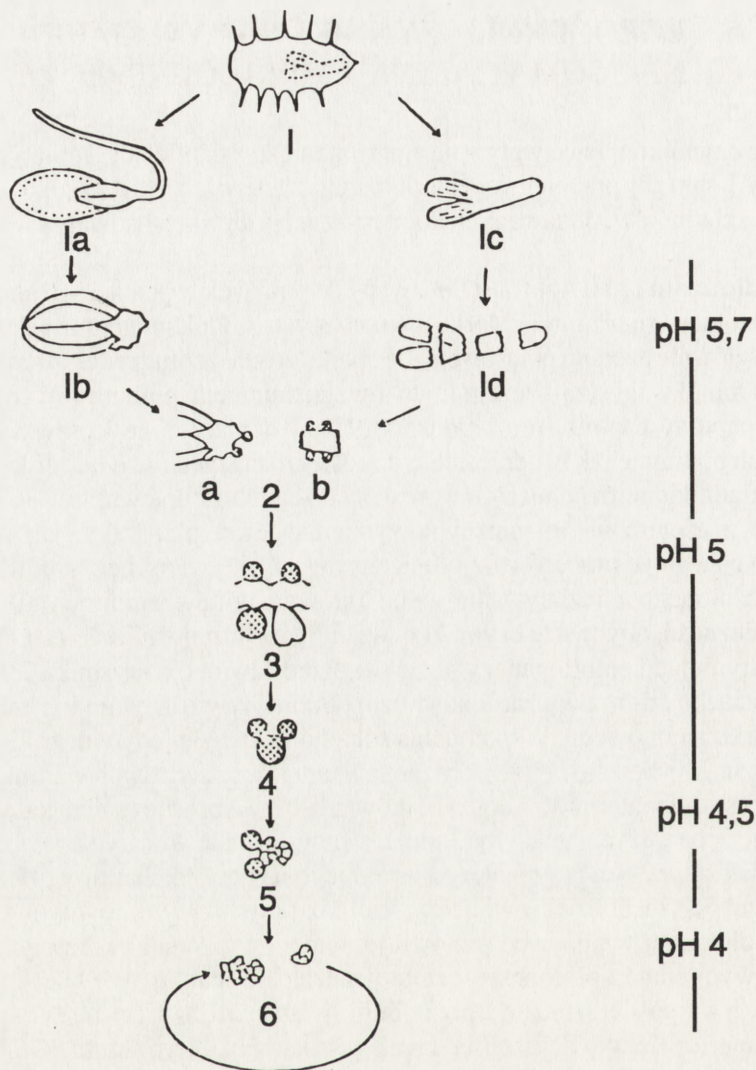
Ogólnie czynniki mające wpływ na embriogeniczność, inicjację somatycznej embriogenezy i sam jej przebieg można podzielić następująco (uporządkowano je w kolejności składników, dodawanych do klasycznej pożywki stosowanej w kulturach *in vitro*):

a) **Źródło azotu i pH.** Azot jest dodawany do pożywek w postaci soli amonowych (głównie azotanu, siarczanu i chlorku), wnoszących zredukowaną formę azotu oraz azotanów (głównie azotanu potasowego). Ponadto źródło azotu zredukowanego mogą stanowić aminokwasy (ze szczególnym uwzględnieniem glutaminy), hydrolizaty białkowe (peptony, edamina) oraz mocznik. Należy zaznaczyć, że w przypadku kultur tkankowych podobnie jak w odniesieniu do roślin rosnących *in vivo* azot jest podstawowym składnikiem różnicującym wzrost, a także go limitującym.

Łącznie z azotem nieorganicznym wymieniane jest pH, które, jak wiadomo, wpływa na całą gamę procesów fizjologicznych (np. aktywności enzymów). Oprócz słabo wyjaśnionego oddziaływania azotu (głównie jonów amonowych) i pH na embriogeniczność, obydwie te czynniki oddziałują na formowanie się zarodków.

Model stymulacji embriogenezy przez pH przedstawiono na rysunku 3. Pożywki, na których zachodził rozwój zarodków, uzupełnione były różnymi (1–5 mM) stężeniami chlorku amonowego. Wspomniana sól amonowa była jedynym źródłem azotu nieorganicznego. Okazało się, że przy zachowaniu rygorystycznych warunków dotyczących czystości materiałów i odczynników udało się z powodzeniem zaindukować embriogenezę bez użycia auksyny. Indukcja powstawania somatycznych zarodków wyraźnie zależała w tym przypadku od ustalonego na początku kultury pH, i tak przy wynoszącym 5,7 zachodziła o wiele częściej niż przy niższym, równym 4,0. Jeżeli jedyne źródło azotu w pożywce stanowił jon amonowy, to siłą rzeczy tylko on był pobierany wymiennie z protonem, co doprowadzało do spadku pH. O ile spadało ono do 4,0–4,5 i w sposób sztuczny (przez buforowanie MES) było na tym poziomie utrzymywane, to selektywnej proliferacji ulegał specyficzny typ tkanki PGSP. Tkanka ta mogła być utrzymywana przez dłuższy czas w formie niezróżnicowanej pod warunkiem ciągłego utrzymywania niskiego pH. Podwyższenie go do 5,7 wyzwało formowanie się zarodków.

W 1979 r. Kamada i Harada [24] opublikowali pracę, która z jednej strony wydaje się znakomicie potwierdzać wcześniejsze dane o roli zredukowanej formy azotu w indukcji embriogeniczności, a z drugiej dokładnie wyznacza moment tej indukcji. Ponadto rzuca ona pewne światło na wpływ, jaki może mieć forma azotu w pożywce na formowanie się zarodków. Autorzy posłużyli się opisywanym już modelem (indukcja embriogenezy wywoływana usunięciem 2,4-D, [19]) odpowiednio go modyfikując. Prowadzili oni kultury zawieszinowe tkanki marchwi na dwóch pożywkach, z których jedna zawierała jony amonowe, druga natomiast nie. Obie oczywiście uzu-



Rys. 3. Inicjacja i ustabilizowanie u marchwi kultur Preglobularnych Stadiów Proembrionów (PGSP) na zbuforowanej, wolnej od hormonów, półpłynnej pożywkę uzupełnionej  $1 \text{ mM NH}_4^+$  jako jedynym źródłem azotu. Dwie tkanki (pochodzące z dojrzałych nasion) [1] były używane jako eksplantaty. Uszkodzone [1c] lub pokrojone [1d] dojrzałe zarodki zygotyczne, a także cała owocnia [1b] po wykiełkowaniu zarodka [1a] mogła być używana do inicjacji globularnych stadiów zarodków somatycznych [2a, 2b] po 4 do 8 tygodni na tej samej pożywkę. Zainicjowane, globularne stadia zarodków często rozwijały się dalej [3], ale jeżeli w czasie proliferacji tkanki pH spadało (jako skutek obecności jonów amonowych jako jedynego źródła azotu), to starsze stadia się nie rozwijały i powstawała mieszanina zarodków i PGSP [5]. Kolejne pasażę (co 2 tyg.) na świeżą pożywkę o  $\text{pH} = 4,5$ , doprowadzały do ustabilizowania kultury złożonej całkowicie z PGSP [6] (za [39])

pełnione były 2,4-D w stężeniu jednego ppm. Reakcjami, które obserwowali po usunięciu 2,4-D z obydwu układów, były odpowiednio ryzogeneza na podłożu wolnym od zredukowanej formy azotu i embriogeneza w pożywce z jonami amonowymi. Obserwowali oni także reakcje, jakie nastąpiły po zamianie tych dwóch układów, tzn. jeżeli dokonano posiewu kultury rosnącej na pożywce ze zredukowaną formą azotu na podłożu jej pozbawionej i odwrotnie. Formowanie się somatycznych zarodków obserwowano w pożywce z jonami amonowymi, pomimo że w poprzedzającej subkulturze na podłożu z 2,4-D brakowało tej formy azotu. Najważniejszy nasuwający się wniosek jest taki, że embriogeniczność została w tkance zaindukowana na podłożu wolnym od auksyny, co dowodzi, że auksyna w indukcji tej kompetencji nie jest niezbędna. Ostatnim przykładem regulacji SE przez zredukowane źródło azotu jest model opracowany dla bawełny (*Gossypium klotzschianum*). Indukcja embriogenezy wywoływana była przez wprowadzenie do pożywki glutaminy [33].

Po indukcji somatycznej embriogenezy w zawieszinach marchwi na pożywce wolnej od regulatorów wzrostu utrzymanie niższego pH (4,3) podwyższało liczbę powstających zarodków, ale zgodnie z modelem Smitha i Krikoriana (rys. 3) hamowało ich dalszy rozwój w starsze stadia. Wyższe pH (5,8) obniżało liczbę powstających zarodków, jednak umożliwiało ich dalszy rozwój i w efekcie konwersję w rośliny [23].

Z przykładów tych wynika jasno, że obecność w pożywce zredukowanego źródła azotu jest niezbędna do istnienia w kulturze merystematycznej tkanki embriogennej. Z drugiej strony wiadomo, że tkanki embriogenne cechowała wybiórczość do pobierania jonów amonowych z pożywki [20].

Reasumując, azot jest najszerzej badanym czynnikiem warunkującym zaistnienie somatycznej embriogenezy, ale jego dokładna rola jest jeszcze nie do końca poznana.

b) **Potas jako jednowartościowy jon  $K^+$** . Badanie wpływu potasu na tkanki w kulturze *in vitro* jest trudne, ponieważ na ogół dodawany jest do pożywek w relatywnie dużym stężeniu, a tym samym usunięcie go powoduje konieczność usunięcia anionów komplementujących. Wprowadzenie tych z kolei w postaci np. soli sodowych drastycznie zmienia skład pożywki, a chodzi przecież o badanie wpływu jednego elementu – potasu. Zastąpienie saletry potasowej w pożywce fosforanem potasowym ( $KH_2PO_4$ ) w kulturach marchwi zaowocowało niewielkim obniżeniem liczby formujących się zarodków somatycznych, gdy z kolei tę ostatnią sól zastąpiono fosforanem sodowym, zarodki nie formowały się w ogóle [7]. Zachowanie takie mogło być istotnie efektem niedoboru potasu lub toksycznym działaniem jonu sodowego. Trudno przyjąć bez zastrzeżeń informacje dotyczące rzekomego podobieństwa kationu potasowego do jonu sodowego [16].

W modelu sterowania embriogenezą opartym na pH (rys. 3) stosowano pożywkę oznaczaną jako DS5. Oprócz wspomnianych modyfikacji dotyczących azotu cechował ją brak jonów potasowych. Jedyne obecne w pożywce pochodziły z wodorotlenku potasowego używanego do doprowadzania pożywki do określonego pH. Dodatek

KOH nigdy jednak nie był większy niż 0,1 mmola na 1 l pożywki [badania własne autora]. W porównaniu np. z pożywką Murashige i Skooga [30] zawierającą ~23 mM  $K^+$  i Gamborga [15] ~30 mM  $K^+$  jest to ilość minimalna. Jak więc jest możliwe, że kultury PGSP rosły na takiej pożywce przez kilka lat i po indukcji wytwarzały zarodki somatyczne? Wynika to prawdopodobnie z tego, że potas nie jest składnikiem strukturalnym, takim jak: węgiel, azot czy fosfor. Jeżeli w pożywce jest mało lub brakuje któregoś z nich, to proliferacja jest zatrzymana. Nie powstają sacharydy (w tym prekursorzy biopolimerów ściany komórkowej), białka, lipidy czy kwasy nukleinowe. W przeciwieństwie do tych pierwiastków rola potasu jest bardziej stymulująca niż determinująca. A z drugiej strony reakcją rośliny na niedobór jakiegoś ze składników jest nienormalny wzrost. W kulturach *in vitro* bardzo często chodzi o uzyskanie takiej czy innej nienormalności we wzroście, której efektem jest chociażby somatyczna embriogeneza.

c) **Wapń.** Dodawany do pożywek najczęściej w postaci chlorku, ale również i azotanu. U marchwi sześciokrotnie wyższe (w porównaniu z pożywką MS) stężenie w płynnym podłożu chlorku wapniowego było w stanie znieść wpływ 2,4-D na somatyczną embriogenezę. Jak wiadomo, 2,4-D hamuje embriogenezę utrzymując tkankę w fazie nieodróżnicowanej. Jeżeli dodatek tego regulatora wzrostu do pożywki wyniósł  $2 \times 10^{-6}$  M, to efekt jego działania był znoszony przez dodatek  $6 \times 10^{-3}$ - $10^{-2}$  M chlorku wapniowego i w zawiesinie pojawiały się struktury globularne [22]. Rozpatrując wapń niewątpliwie należy także pamiętać o jego roli w stabilizacji ściany i błony komórkowej [18]. Ponadto wiadomo o roli w somatycznej embriogenezie systemu aktywacji fosfataz przez kalmodulinę, która jak wiadomo jest ściśle związana zarówno z wapniem, jak i z mechanizmem przekazywania informacji opartym na cyklicznym AMP i GTP [40]. Wapń i jego pobieranie, podobnie jak w przypadku potasu, jest ściśle związane z działaniem pompy protonowej [6].

d) **Węglowodany.** Pełnią one w kulturach *in vitro* dwie zasadnicze role. Po pierwsze stanowią źródło węgla organicznego wykorzystywane jako materiał energetyczny oraz jako substrat do syntezy w szlakach metabolicznych, a z drugiej strony w porównaniu z innymi składnikami klasycznych pożywek używanych w kulturach *in vitro* stanowią silne osmoticum. Najczęściej stosowanym w kulturach *in vitro* węglowodanem jest sacharoza. Przed pobraniem jest ona rozkładana przez ekstracelularną lub membranową inwertazę do glukozy i fruktozy. W dalszej kolejności są pobierane monosacharydy z większą lub mniejszą preferencją do glukozy. Zależności takie miały miejsce w kulturach marchwi, lucerny i soi [10,26].

Kultury zawieszinowe marchwi w czasie wzrostu niezorganizowanego (cykl auksynowy [4]), a także po zaindukowaniu w nich embriogenezy były w stanie wykorzystywać jako źródło węgla organicznego także samą: glukozę, fruktozę, mannozę, maltozę, rafinozę lub stachylozę [43]. Obecność w pożywce glukozy lub galaktozy jest istotna, ponieważ są one prekursorami w biosyntezie mezo-inozytolu – bardzo ważnego składnika budulcowego błon komórkowych [44, 45]. Różnice w pobieraniu

z pożywki monosacharydów przez embriogenne i nieembriogenne kultury były obserwowane także u ogórka [8]. Wśród opisanych sacharydów mających wpływ na SE w kulturach marchwi należałoby jeszcze wymienić mannitol. Cukier ten był stosowany do podwyższania potencjału osmotycznego głównie płynnych pożywek. 0,2 M dodane do pożywki stymulowało podziały komórek Specyficznego Typu 1 [31].

e) **Auksyny i ich analogi.** Auksyny i związki o podobnym działaniu hamują różnicowanie, czyli stymulują odróżnicowanie [46,4]. Oprócz więc tego, że oddziałując odróżnicująco np. na eksplantaty pierwotne wyzwalają w nich embriogeny potencjał, mają także bardzo istotny wpływ na przebieg somatycznej embriogenezy będącej jak wiadomo z morfogenetycznego punktu widzenia różnicowaniem. Ewidentnym tego dowodem jest funkcjonowanie (nie tylko u modelowej marchwi) cyklu auksynowego [4]. Próg hamowania somatycznej embriogenezy marchwi ustalono dla 2,4-D na  $10^{-9}$ M, a dla IAA na  $10^{-10}$ M [14]. Rola 2,4-D może polegać na stymulacji syntezy endogennej IAA. Zależność ta nie polega jednak na bezpośrednim oddziaływaniu na szlaku biosyntezy tego naturalnego regulatora wzrostu z tryptofanu [29]. U rzepaku do zaindukowania embriogenezy z tkanki proliferującej na pożywce z NAA, wystarczała 2 godz. ekspozycja na 2,4-D [11]. Z auksyn używanych do zainicjowania somatycznej embriogenezy z różnych eksplantatów i u różnych taksonów, najważniejszy jest niewątpliwie 2,4-D. Poza tym stosowano także 2,4,5-T, NAA, picloram, rzadziej IAA i inne.

f) **Cytokininy.** BAP stymulowała proliferację tkanki marchwi, w efekcie jednak hamowała jej embriogeny potencjał. Wykazano, że w zawiesinach marchwi BAP i kinetyna hamowały powstawanie zarodków somatycznych na podłożu wolnym od innych regulatorów wzrostu, natomiast zeatyna w stężeniu  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  wywierała efekt stymulujący [14]. Wyższe stężenia tego regulatora wzrostu proces hamowały. Stymulujący wpływ zeatyny był widoczny po dodaniu jej 3–4 dni po indukcji embriogenezy w wolnej od auksyn pożywce.

g) **Kwas abscyzynowy – ABA.** W roślinach rosnących *in vivo* jest łącznie z giberelinami związany z regulacją procesów wzrostowych i inicjacji generatywnej przez układ fitochromowy. Ponadto reguluje gospodarkę wodną rośliny, a także pojawia się w czasie ekspozycji rośliny na czynniki stresowe i przystosowywanie się do nich. Podobna funkcja jak przy dojrzewaniu zarodków zygocycznych przypisana została temu związkowi także w czasie embriogenezy somatycznej [2, 14]. Ponadto oddziaływał on także bardziej specyficzniej. U marchwi jedną z często występujących nienormalności w rozwoju zarodków somatycznych jest wieloliścieniowość (rys. 2). Pomimo hamowania przez ABA procesu inicjacji powstawania zarodków z tkanki proembriogennej, to dalsze fazy były przez ten związek stymulowane. Stymulacja polegała na tym, że dodanie do synchronicznej kultury, wtedy gdy zarodki są w stadium sercowatym, zwiększało odsetek zarodków rozwijających się normalnie [2]. Podobne efekty obserwowano także u lucerny i świerka [12].

**h) Etylen.** Embriogenne kultury zawieszinowe marchwi syntetyzowały go w czasie eksplotencjalnej fazy wzrostu [5]. Jako egzogeny, może być wprowadzany do kultur *in vitro*, w dwóch postaciach: jako wolny gaz i jako etephon (związek który w kontakcie z wodą rozkłada się, w wyniku czego powstaje wolny gaz). Generalnie etylen hamował przebieg SE u wielu roślin (w tym także drzew iglastych). Na odwrót, inhibitory biosyntezy etylenu (takie jak  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , i  $\text{Ag}^+$  oraz kwasy: salicylowy i acetylosalicylowy wprowadzone w określonych stężeniach) proces stymulowały [5, 36].

Nieembriogenne kalus *Picea abies* cechowała dużo większa produkcja etylenu w porównaniu z kalusem embriogenym. Należy zwracać także uwagę na konieczność dokładnego dobrania stężenia przy traktowaniu wolnym etylenem i etephonem, od czego zależy oczekiwany efekt. W czasie indukcji SE z uszkodzonych zarodków zygocytynych i merikarpów na wolnym od regulatorów wzrostu podłożu u marchwi obserwowano efekt hamowania procesu, jeżeli zawartość tego gazu w atmosferze nad kulturą wynosiła 0,5 i 1,0 ppm [39].

**i) Poliaminy.** Wiadomo, że somatycznej embriogenezie towarzyszy synteza endogennych poliamin, a ich poziom zależy od stadium zarodków somatycznych. Dodane jako egzogenne wyraźnie stymulowały embriogenezę bezpośrednią z eksplantatów pierwotnych u kilku przebadanych gatunków [28]. Metabolizm poliamin wiąże się ściśle z metabolizmem azotu [1].

**j) Stres.** Sam stres jest oczywiście pojęciem bardzo szerokim i nie do końca zdefiniowanym. Kultury *in vitro* tkanek roślinnych można traktować jako stresowe, a samo zjawisko wzrostu tkanek w sztucznie stworzonych warunkach jest reakcją rośliny na uszkodzenie związane z pobraniem eksplantatu [21,37], traktowanie regulatorami wzrostu itd. W porównaniu jednak do "normalnych" warunków kultury *in vitro*, zastosowano w nich takie czynniki stresujące, jak: chlorek sodowy, jony metali ciężkich (kadm, kobalt, nikiel, cynk) i sacharoza (ta ostatnia w stężeniu 0,3–0,7 M, czyli  $\sim 100\text{--}300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) [21]. W warunkach takich z merystemów apikalnych (modelowej marchwi) formowały się somatyczne zarodki bez widocznego udziału tkanki kalusowej. Proces ten miał miejsce bez jakiegokolwiek stymulacji egzogennymi regulatorami wzrostu. Zarodki somatyczne powstawały także w czasie kiełkowania nasion wysterylizowanych w roztworze podchlorynu sodu o wysokim stężeniu (co prowadziło do częściowego uszkodzania zawartych w nich zarodków zygocytynych).

## 6. EMBRIOGENNE KULTURY PŁYNNE U OGÓRKA

Z prowadzonych przez nas badań na ogórku wynika, że merystematyczny charakter nie wystarcza do podjęcia przez komórki ukierunkowanych podziałów, w wyniku których powstaje somatyczny zarodek. Istotną rolę (a może kluczową) odgrywają tutaj przestrzenne orientacje komórek, czyli informacja pozycyjna. Innymi słowami to, czy



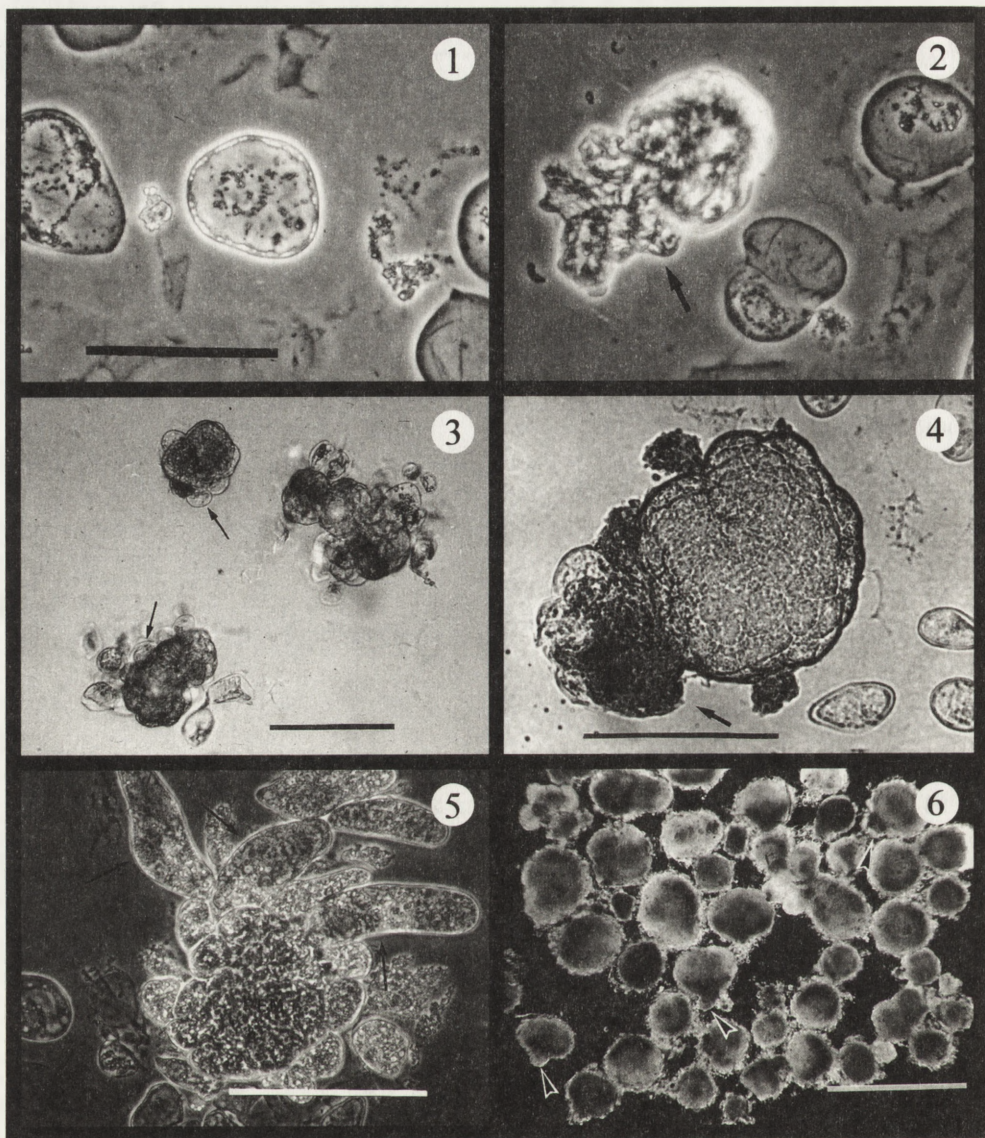
z grupy komórek o charakterze proembriogennym uformuje się zarodek somatyczny, zależy od usytuowania ich w stosunku do innych, nie uczestniczących w formowaniu embrionu. (Podobnie jak zygota oprócz kompetencji ma informację pozycyjną.)

Badania na ogórku wskazują, że w większości przypadków auksyna używana do indukowania embriogenezy somatycznej jest potrzebna do zaindukowania podziałów i wyzwolenia w komórkach potencjału proembriogenicznego (podobną rolę odgrywa niskie pH). Obecność auksyny lub presja niskiego pH wydaje się nie być jednak kluczowym determinantem przy indukowaniu embriogeniczności w komórkach proembriogennych. Rolę tę przypisać należy niewątpliwie zredukowanemu źródłu azotu, a szczególnie jonom amonowym. Były one niezbędne do indukcji embriogeniczności. Merystemy apikalne pobrane z siewek ogórka byływ stanie reagować wytwarzając somatyczne zarodki na pożywce wolnej od regulatorów wzrostu. Do zaindukowania tego procesu wystarczało uszkodzenie towarzyszące pobraniu eksplantatu i obecność w podłożu jonów amonowych.

W ustalonych kulturach zawiesinowych ogórka (fot. 1) stwierdziliśmy dużo analogii do zjawisk opisywanych u marchwi [48]. Jeżeli zawiesina proliferuje na pożywce uzupełnionej auksyną i jonami amonowymi, to pojawiają się w niej proembriogenne Komórki Specyficznego Typu 1 (dzielące się często nierównocennie) i agregaty masy proembriogenicznej – PEM (fot. 2 i 3). Zmiana pożywki, na wolną od 2,4-D doprowadza do powstawania zarodków somatycznych z tych agregatów. Ponieważ liczba PEM w 1 ml zawiesiny może dochodzić do kilkunastu, tyle też zarodków można otrzymać z tej objętości płynnej kultury. Łatwo także wyobrazić sobie wydajność takiego systemu, jeżeli z kolby zostanie przeniesiony do skali kilkusetlitrowego bioreaktora.

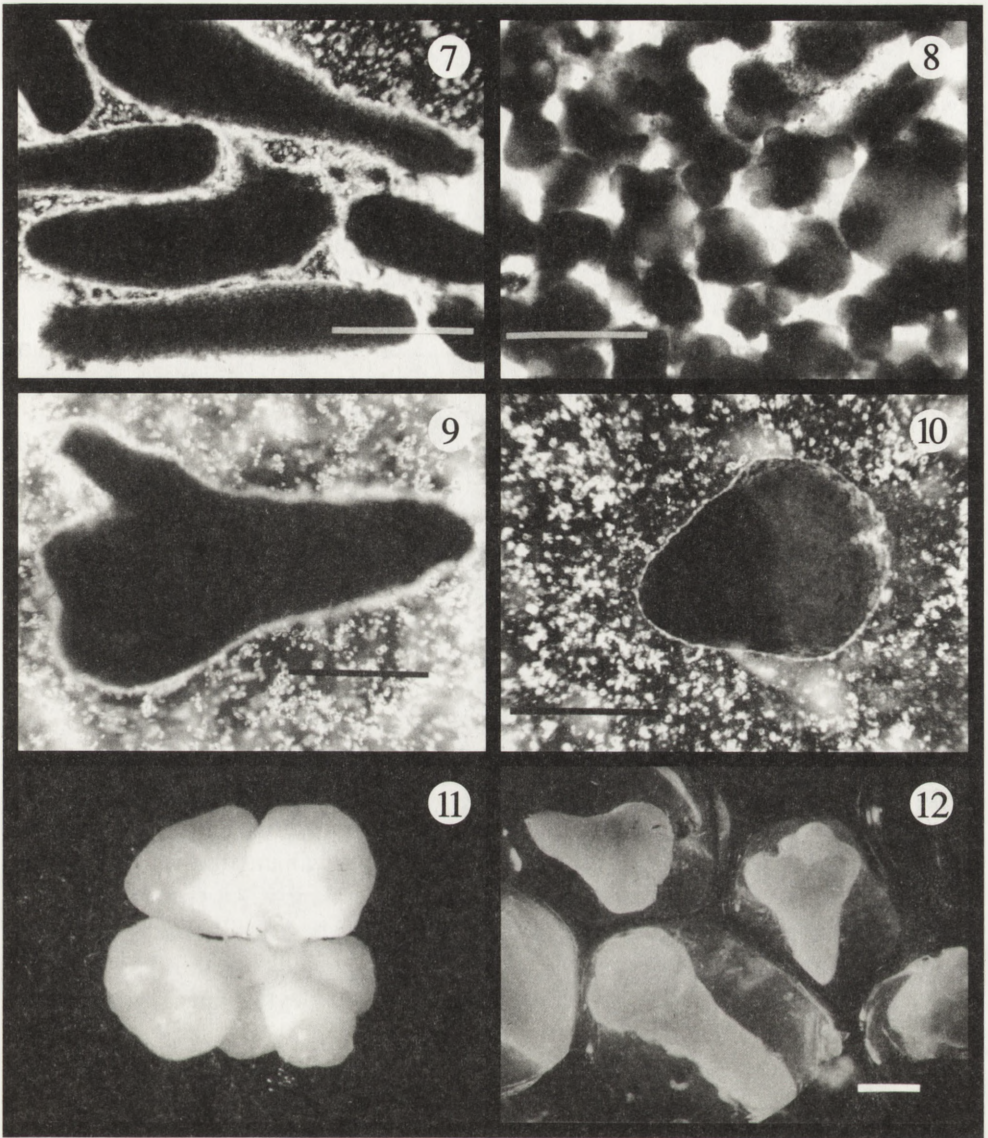
U marchwi stwierdzono histologicznie istnienie dwóch typów masy proembriogenicznej [42]. Niektóre z jej agregatów były zbudowane z drobniejszych, bogatych w cytoplazmę i skrobię komórek, inne z komórek nieco większych, z większymi wakuolami, nie zawierających skrobi. Obserwacje prowadzone przez nas na ogórku również wskazują na istnienie przynajmniej dwóch typów PEM (fot. 4). Zauważyliśmy ponadto, że formowanie się zarodków somatycznych odbywa się w zależności od struktury tych agregatów [48], przy czym istnieje tu zależność: Im więcej skrobi zawiera kilkunasto- lub kilkudziesięciokomórkowy agregat, tym mniej komórek wchodzących w jego skład uczestniczy w formowaniu zarodka somatycznego. Od 1 do 4 lub 5 komórek wchodzących w skład PEM dzieląc się daje początek zarodkowi. W skrajnych przypadkach, z agregatów PEM zawierających dużo skrobi, zarodki nie powstają w ogóle.

Masa proembriogeniczna powstaje niewątpliwie dwoma drogami. Jedną z nich są nierównocenne podziały Komórek Specyficznego Typu 1, drugą natomiast fragmentacja większych agregatów. W czasie nabywania przez ustalone zawiesiny ogórka embriogeniczności w kulturach pojawiają się komórki skrobionośne. Komórki te mają cytrynowaty kształt i wewnątrz charakterystyczny układ cytoplazmy. Często także



**Fot. 1.** Typowa pojedyncza komórka w ustabilizowanej embriogenicnej kulturze zawiesinowej ogórka. 1 ml kultury zawierał w fazie stacjonarnej ok.  $8 \times 10^5$  takich komórek (podziałka = 20  $\mu\text{m}$ ). **Fot. 2.** Pierwsze podziały komórek Specyficznego Typu 1, w wyniku których powstawały agregaty PEM. Strzałką zaznaczono pozostałości komórek proembriogenicznych (podziałka = 20  $\mu\text{m}$ ). **Fot. 3.** Agregaty masy proembriogenicznej PEM w ustabilizowanej embriogenicnej kulturze zawiesinowej ogórka. Strzałkami zaznaczono komórki proembriogeniczne, z których powstał PEM (podziałka = 100  $\mu\text{m}$ ). **Fot. 4.** Agregat, w którego skład wchodzi dwa typy masy proembriogenicznej PEM w kulturze zawiesinowej ogórka. Ciemniejsza, oznaczona strzałką część agregatu zbudowana jest z komórek bogatych w skrobię (podziałka = 50  $\mu\text{m}$ ). **Fot. 5.** Wydłużone komórki skrobiennie towarzyszące agregatowi PEM w kulturze zawiesinowej ogórka (podziałka = 50  $\mu\text{m}$ ). **Fot. 6.** Globularne i sercowate stadia zarodków somatycznych 9 dni po posiewie ustabilizowanej embriogenicnej kultury zawiesinowej ogórka na wolne od regulatorów wzrostu płynne podłoże.

Strzałkami oznaczono pozostałości po masie proembriogenicznej (podziałka = 1 mm)



**Fot. 7.** Zarodki somatyczne ogórka, w których zastymulowano, relatywnie wysoką zawartością jonów azotanowych w pożywce, przerost części radykularnej-korzeniowej. (podziałka = 1 mm). **Fot. 8.** Zarodki somatyczne ogórka, w których zastymulowano (głównie poprzez relatywne zwiększenie zawartości jonów amonowych w pożywce) przerost części pędowej-plumularnej. Anomalia ta objawia się pojawieniem się bardzo dużych stadiów globularnych. W zarodku zygocyticznym stadium globularne ma ok. 100–200  $\mu\text{m}$  średnicy (podziałka = 1 mm). **Fot. 9.** Zarodek somatyczny ogórka z trzema liścieniami. Wieloliścieniowość zarodków była także obserwowana w embriogenicnych kulturach marchwi (rys.2) (podziałka = 1 mm). **Fot. 10.** Zarodek somatyczny ogórka, w którym nastąpił przerost części pędowej-plumularnej (patrz dla porównania rys. 2) (podziałka = 1 mm). **Fot. 11.** Zarodki somatyczne ogórka, w których nasąpił wyraźny przerost części pędowych (plumularnych). Wszystkie zwrócone są biegunem korzeniowym (radykularnym) w stronę agregatu PEM, z którego powstały (objaśnienia w tekście; podziałka = 1 mm). **Fot. 12.** Zarodki somatyczne ogórka zamknięte w alginianowych kapsułkach (podziałka = 1 mm)

towarzyszą agregatom PEM (fot. 5). Dotychczas jednak nie wyjaśniliśmy roli, jaką odgrywają one w powstawaniu masy proembriogenicznej. PEM jest znakomitym obiektem do obserwacji najwcześniejszych momentów inicjacji morfogenezy. Od jego wielkości zależy to, ile powstanie somatycznych zarodków. Z naszych obserwacji wynika, że z agregatów o śr. nie przekraczającej 80–90  $\mu\text{m}$  (~20–30 komórek) formuje się na ogół jeden zarodek. Z większych, szczególnie jeżeli są one pofragmentowane, kilka.

W zawiesinach komórkowych możemy mieć do czynienia z dwoma rodzajami synchronizacji. Pierwszy dotyczy podziałów komórkowych i uzyskiwany jest np. głodem fosforanowym, drugi typ to synchronizacja procesów.

Synchronizacja procesu somatycznej ebrigeznej doprowadza do wytwarzania zarodków somatycznych takiej samej wielkości oraz będących w takim samym stadium, a wywołuje ją usunięcie starej pożywki i zastąpienie jej nową, pozbawioną 2,4-D. W związku jednak z tym, że początek zarodkowi daje jedna lub kilka komórek masy proembriogenicznej oraz z tym że z większych agregatów PEM rozwijają się szybciej, największą synchronizację procesu można otrzymać używając do zainicjowania kultury tylko określonej frakcji agregatów PEM. (Im mniejszej, tym rozwijające się z nieorganizowanych agregatów zarodki są bardziej regularne, ale z jednego ml zawiesiny otrzymuje się ich mniej.) Jeżeli używa się do posiewu tylko frakcji zawierającej pojedyncze komórki i ew. dwukomórkowe agregaty, zarodki nie rozwijają się w sposób synchroniczny, ponieważ i tak wcześniej z pojedynczych komórek powstają agregaty PEM, a dopiero te po osiągnięciu określonej wielkości formują zarodki. U ogórka największą synchroniczność procesu otrzymywaliśmy używając do posiewu na wolne od regulatorów wzrostu płynne podłoże frakcji 50–80  $\mu\text{m}$  (fot. 6). Przy posiewie frakcji mniejszej od 150  $\mu\text{m}$  otrzymywaliśmy do kilkunastu zarodków somatycznych z 1 ml zawiesiny podstawowej, używając większych frakcji – więcej, ale bardziej zróżnicowanych w wielkości i morfologii. Uzyskiwane wydajności są porównywalne z wynikami uzyskiwanymi u marchwi [2].

Proporcje części pędowej (plumularnej) do korzeniowej (radykularnej) w rozwijających się zarodkach somatycznych ogórka zależą od proporcji i ogólnej zawartości jonów amonowych i azotanowych w pożywce. Zmieniając więc zawartości tych składników w pożywce można wpływać na rozwój zarodków tak, aby był on zbliżony do normalnego [50] (fot. 7 i 8). W rozwijających się na wolnej od auksyny pożywce zarodkach somatycznych ogórka zaobserwowaliśmy wiele podobnych jak u marchwi anomalii. Wśród nich wytwarzanie wielu liścieni (fot. 10) lub ich zupełny brak (fot. 10).

Z morfologią zarodków somatycznych wiąże się jeszcze jedno zjawisko, które mimo że obserwowane w bardzo wielu pracach, pomijane jest najczęściej w dyskusji. Chodzi o polarność w ich rozwoju. W kulturach zawiesinowych typu *short-term* zainicjowanych z kalusa u ogórka [25] nie dało się wyraźnie zaobserwować zależności we wzajemnym przestrzennym ułożeniu rozwijających się zarodków. W embriogen-

nych zawiesinach ustalonych (*long-term*) otrzymanych ze stożków wzrostu u tej rośliny formujące się somatyczne zarodki, o ile oczywiście powstaje ich obok siebie kilka, były zawsze zwrócone częściami plumularnymi odśrodkowo, radykularnymi natomiast dośrodkowo. Odnosi się wrażenie, że proliferacja merystematycznej, apikalnej tkanki, w wyniku której zachodzi rozwój zarodków, "przeszkadza" sobie nawzajem. Części plumularne rozwijających się zarodków jakby się odpychały, a radykularne przyciągały (fot. 11).

Z naszych doświadczeń wynika, że przebieg zmian pH pożywki w czasie trwania wzrostu w kulturze tkanek embriogennych różni się w porównaniu z tkankami nieembriogennymi [49]. Charakterystyczne zmiany pH skorelowane były z kolei z pobieraniem z pożywki jonów amonowych lub azotanowych. Linie embriogenne intensywniej pobierały jony amonowe. (Koresponduje to z innymi danymi literaturowymi dotyczącymi np. brzozy [32].) Przeprowadzone analizy aktywności syntazy glutaminowej nie wykazały istotnych różnic pomiędzy obydwooma typami tkanek, wobec tego wszystko wskazuje na to, że istotną rolę w embriogeniczności odgrywa aktywność ATP-zależnego, błonowego białka – pompy protonowej.

## 8. WYKORZYSTANIE SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY W PRODUKCJI ROŚLINNEJ

Na skalę laboratoryjną embriogenne kultury zawiesinowe oraz kultury zarodków somatycznych prowadzone są w objętościach nie przekraczających  $1\text{ dm}^3$ . Związane jest to z objętością używanych naczyń oraz z niewielkim na ogół zapotrzebowaniem na materiał do analiz. Objętość  $1\text{ dm}^3$  ustalonej embriogennej kultury zawiesinowej ogórka zawiera w plateau wzrostu 40–50 g tkanki. Masę taką otrzymuje się po ok. 14 dniach z 4–5 gramów inokulum. Posiew takiej objętości kultury na pożywkę wolną od regulatorów wzrostu dostarcza z reguły od kilkuset do kilkunastu tys. zarodków somatycznych. Łatwo wyobrazić sobie, jakie wydajności mogą być osiągnęte przy przeniesieniu skali takich kultur z kolb do kilkusetlitrowych bioreaktorów.

Oprócz produkcji wtórnych metabolitów jedną z biotechnologii opracowywanych i stosowanych u roślin jest produkcja somatycznych nasion (*somseed*), czyli zarodków somatycznych przetworzonych w taki sposób, aby mogły one być użyte komercyjnie [17].

Jako somatycznych nasion używa się zarodków somatycznych świeżych i wysuszonych. Zarówno jedne, jak i drugie mogą być zakapsułkowane w alginianowe (fot. 12) lub silikonowe otoczki, które podobnie jak łupina nasienna fizycznie ochraniają zawarte w nich zarodki. Składnikami takich otoczek mogą być substancje odżywcze, regulatory wzrostu, pestycydy i antybiotyki. Kapsułki umożliwiają także stopniową hydratację w przypadku zarodków wysuszonych. Wysuszone somatyczne zarodki

mają tą przewagę nad świeżymi, że można je przechowywać przez dłuższy czas bez utraty zdolności do kiełkowania, co w przypadku tych drugich następuje po kilku tygodniach. Do suszenia zarodki somatyczne muszą być jednak dużo dokładniej przygotowane. Przygotowanie takie polega na hartowaniu przy użyciu m.in. regulatorów wzrostu (np. ABA) i zmianach potencjału osmotycznego środowiska [3,17].

Przyczyny, dla których podejmuje się opracowanie technologii produkcji somatycznych nasion dla określonego gatunku, są następujące :

1) praktycznie nieograniczona możliwość produkcji zdrowego i wyrównanego materiału siewnego,

2) możliwość masowego rozmnażania tych form, które albo nie wytwarzają nasion (cecha bardzo pożądana u niektórych owoców i warzyw), albo nie przekazują korzystnych cech generatywnemu potomstwu, a więc ciekawych pojedynków, triploidów i mieszańców heterozyjnych;

3) uniezależnienie produkcji materiału siewnego od warunków pogodowych oraz pory roku, a także sprowadzenie jej do małej powierzchni laboratorium biotechnologicznego;

4) możliwość bardzo szybkiego wprowadzania do uprawy nowych odmian (w tym otrzymanych z form transgenicznych), przy czym materiał siewny ma jakość super-elity;

5) w porównaniu z klasycznymi technikami mikropropagacji przy użyciu kultur *in vitro* (mikrosadzonki z kultury merystemów) materiał siewny w postaci zarodków somatycznych można przechowywać i otrzymywać rośliny w dowolnym terminie;

6) ze względu na płynne środowisko kultur istnieje możliwość całkowitej automatyzacji procesu produkcji materiału siewnego.

Z drugiej strony pojawiają się problemy, które uniemożliwiają (przynajmniej w obecnej chwili) wprowadzenie takich technologii dla niektórych roślin uprawnych. Trudności te sprowadzają się do następujących spraw:

1. Nie u wszystkich roślin udaje się otrzymywać somatyczne zarodki, co więcej różną predyspozycją do ich wytwarzania cechują się nie tylko odmienne gatunki, ale również formy w obrębie gatunku [35, 49].

2. Technologia somatycznych nasion wymaga powtarzalnych procedur otrzymywania zarodków somatycznych wyrównanych i nadających się do zatrzymania w rozwoju, a nie zawsze problemy te udaje się rozwiązać. Opracowanie takich procedur jest na ogół długotrwałe (kilka do kilunastu lat).

3. Pomimo że rozmnażanie roślin drogą somatycznej embriogenezy jest formą klonowania, czyli rozmnażania wegetatywnego, nie zawsze gwarantuje stabilność genetyczną materiału, a co za tym idzie powtarzalność cech w stosunku do materiału wyjściowego. Problem ten jest szeroko badany i znane są już techniki pozwalające zminimalizować tzw. zmienność somaklonalną.

Dotychczas u żadnej rośliny nie wprowadzono do handlu detalicznego suchych somatycznych nasion zdolnych do kiełkowania w warunkach polowych, aczkolwiek

u wielu gatunków technologia ta jest już z powodzeniem stosowana w produkcji sadzonek w specjalistycznych zakładach. Najdalej posunięte są badania nad marchwią, selerem, roślinami kapustnymi, kawą, soją, rzepakiem, lucerną, bawełną, świerkiem oraz niektórymi roślinami ozdobnymi.

## 9. ZAKOŃCZENIE

Somatyczna embriogeneza jest obecnie jednym z najintensywniej badanych zjawisk w kulturach *in vitro* tkanek roślinnych. Pomimo tego wiele zagadnień z nią połączonych pozostaje nadal nierozwiązanych. Dużo uwag poświęca się technikom związanym z otrzymywaniem zarodków somatycznych na dużą skalę i sterowaniem ich rozwojem tak, aby mogły być użyteczne jako materiał siewny oraz (lub) jako substrat do produkcji wtórnych metabolitów. Systemy opracowane w kulturach *in vitro* są także od blisko 10 lat modelami do badań molekularnych. Podobnie, jak w przypadku prac histologicznych, ich wyniki otrzymane na materiale pochodzącym z kultur, odnoszone są do tego, co dzieje się w roślinie rosnącej *in vivo*. Znajomość tego systemu pozwalającego regenerować kompletne rośliny z tak małych elementów, jak pojedyncze komórki i protoplasty, znajduje także zastosowanie przy otrzymywaniu roślin transgenicznych (w tym mieszańców somatycznych).

## LITERATURA

- [1] ALTMAN A, LEVIN N. Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiol Plant* 1993; **89**: 653–658.
- [2] AMMIRATO P V. Organizational events during somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Cell Cult* 1986: 57–81.
- [3] AMMIRATO P V. Scale - up: Artificial seeds. *Plant Tissue and Cell Culture* 1987: 473–493.
- [4] BHOJWANI S S, RAZADAN M K. *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B. V. 1983: 159–180.
- [5] BIDDINGTON N L. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 1992; **11**: 173–187.
- [6] BRISKIN P D, HANSON J B. How Does the Plant Plasma Membrane H<sup>+</sup> -ATPase Pump Protons? *J Exper Bot* 1992; **248**: 269–289.
- [7] BROWN S, WETHERELL D F, DOUGALL D K. The potassium requirement growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol Plant* 1976; **37**: 73–79.
- [8] CALLEBAUT A, MOTTE J C. Growth of cucumber cells in media with lactose or milk whey as carbon source. *Plant Cell Rep* 1988; **7**: 162–165.
- [9] CARMAN J G. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behaviour. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; **26**: 746–753.
- [10] DENCHEV P D, KULKLIN A I, ATANASOV A I, SCRAGG A H. Kinetic studies of embryo development and nutrient utilisation in an alfalfa direct somatic embryogenesis system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1993; **33**: 67–73.

- [11] DUDITS D, BOGRE L, GYORGYEY J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J Cell Sci* 1991; **99**: 475–484.
- [12] DUNSTAN D I, BEKKAOUF, PILON M, FOWKE L C, ABRAMS S R. Effects of Abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca* L.) somatic embryos. *Plant Sci* 1988; **58**: 77–84.
- [13] FUJIMURA T, KOMMAMINE A. The serial observation of embryogenesis in carrot cell suspension culture. *New Phytol* 1980; **86**: 213–218.
- [14] FUJIMURA T, KOMMAMINE A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Plant Sci Lett* 1975; **5**: 359–364 .
- [15] GAMBORG O L, MILLER R A, OJIAMA K. Plant cell cultures. *Exp Cell Res* 1968; **50**: 151–158.
- [16] GEORGE E F, PUTTOCK D J M, GEORGE H J. Plant culture media. Commentary and Analysis 1988 Vol. 2.
- [17] GRAY D J, PUROHIT A. Somatic embryogenesis and Development of Synthetic Seed Technology. *Critical Rev in Plant Sci* 1991; **10**(1): 33–61.
- [18] GRIGNON C, SENTENACH. pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; **42**: 103–128.
- [19] HALPERIN W. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Amer J Bot* 1966; **53**(5): 443–453.
- [19] HALPERIN W, WETHERELL D F. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* (London) 1965; **205**: 519–520.
- [21] HARADA H, KIYOSUE T, KAMADA H, KOBAYASHI K. Stress - Induced Somatic Embryos and their Applicability to Synthetic Seed. [w]The impact of Biotechnology in Agriculture R.S.Sangwan and B.S.Sangwan-Norel (eds), 1990: 129–157.
- [22] JANSEN M A K, BOOIJ H, SCHEL J H N, de VRIES S C. Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 1990; **9**: 221–223.
- [23] JAY V, GENESTIER S, COURDUROUX J C. Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1994; **36**: 205–209.
- [24] KAMADA H, HARADA H. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of aminoacids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol* 1979; **91**: 225–266.
- [25] MALEPSZY S, SOLAREK E. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L.IV. Conditions for cell suspension. *Gen Pol* 1986; **27**: 249–254.
- [26] MC DONALD A, JACKMAN A P. Bioreactor studies of growth and nutrient utilisation in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports* 1989; **8**: 455–458.
- [27] MC WILLIAM A A, SMITH S M, STREET H E. The Origin and Development of Embryoids in Suspension Cultures of Carrot (*Daucus carota*). *Ann Bot* 1972; **38**: 243–250.
- [28] MENGOLI A, BAGNI T C. Polyamines and somatic embryogenesis in higher plants. *Newsletter IAPTC* 1992; **68**: 2–8.
- [29] MICHALCZUK L, COOKE T J, COHEN J D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 1992; **31**: 1097–1103.
- [30] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum* 1962; **15**: 473–497.
- [31] NOMURA K, KOMMAMINE A. Identification and Isolation of Single Cells that Produce Somatic Embryos at a High Frequency in a Carrot Suspension Culture. *Plant Physiol* 1985; **79**: 988–991.
- [32] NUUTILA A M, KAUPPINEN V. Nutrient uptake and growth of an embryogenic and non-embryogenic cell line birch (*Betula pendula* Roth.) in suspension culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1992; **30**: 7–13.



- [33] PRICE HJ, SMITH RH. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Andress. *Planta* 1979; **145**: 305–307.
- [34] RAGHAVAN V. Embryogenesis in Angiosperms. A Developmental and Experimental Study. Cambridge University Press 1986.
- [35] RAKOCZY-TROJANOWSKA M, MALEPSZY S. Wpływ czynników genetycznych na regenerację roślin w kulturach *in vitro*. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 247–257.
- [36] ROUSTAN J P, LATCHE A, FALLOT J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep* 1989; **8**: 182–185.
- [37] SMITH D L, KRIKORIAN A D. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryogenic cultures on hormone-free medium. *Amer J Bot* 1989; **76**: 1834–1845.
- [38] SMITH D L, KRIKORIAN A D. pH control of somatic embryogenesis. Abstracts of International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, June 1990: 454–459.
- [39] SMITH D L, KRIKORIAN A D. Somatic embryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep* 1990; **9**: 34–37.
- [40] STEWRD F C. Growth and organised development of cultured cells to carrot plant. *Am J Bot* 1958; **45**: 709–713.
- [41] TAZAWA M, REINERT J. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma* 1969; **68**: 157–173.
- [42] TIMMERS A CJ (red.), de VRIES SC, TIRLAPUR UK, SCHEL JHN. Imaging of polarity during zygotic and somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Publikacja monograficzna. Department of Plant Cytology and Morphology, Dep. of Molecular Biology; Agricultural University, Wageningen, 1993.
- [43] VERMA DC, DOUGALL DK. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol* 1977; **59**: 81–85.
- [44] VERMA DC, DOUGALL DK. Biosynthesis of myo-inositol and its role as a precursor of cell-wall polysaccharides in suspension cultures of wild-carrot cells. *Planta* 1979; **146**: 55–62.
- [45] VERMA DC, DOUGALL DK. Myo-inositol biosynthesis and galactose utilisation by wild-carrot (*Daucus carota* L. var. *carota*) suspension cultures. *Ann Bot* 1979; **43**: 259–269.
- [46] WAREING PF, PHILIPS IDJ. Wzrost i różnicowanie się roślin. PWN Warszawa, 1985.
- [47] WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Bot* 1986; **57**: 443–462.
- [48] WRÓBLEWSKI T, MALEPSZY S. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. XVI. Established long-term culture. Fifth EUCARPIA *Cucurbitaceae* Symposium 1992: 104–107.
- [49] WRÓBLEWSKI T, DMYTRZAK K, MALEPSZY S. Factor influencing cucumber (*Cucumis sativus* L.) somatic embryogenesis in liquid culture. Relations between seedlings and tissues behaviour. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture 1994: 188.
- [50] WRÓBLEWSKI T, FILIPECKI M, MALEPSZY S. Factors influencing cucumber (*Cucumis sativus* L.) somatic embryogenesis. I. The crucial role of pH and nitrogen in suspension culture. 1994(in press)

T. A. Wróblewski  
02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166



## REGULACJA AKTYWNOŚCI GENÓW PODCZAS EMBRIOGENEZY U ROŚLIN

### REGULATION OF GENE ACTIVITY DURING PLANT EMBRYOGENESIS

Marcin K. FILIPECKI, Tadeusz WRÓBLEWSKI, Stefan MALEPSZY

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie.* Techniki klonowania genów stworzyły nowe możliwości w wielu obszarach badań, w tym także w embriogenezie roślin, procesie badanym przez wielu naukowców innymi metodami. Zmiany ekspresji genów w czasie embriogenezy bada się obecnie korzystając z konwencjonalnego modelu rozwoju zarodka zygotycznego lub embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro*. Pierwszy model wykorzystuje przede wszystkim bogate kolekcje mutantów zarodkowych. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja i analiza głównie genów warunkujących akumulację materiałów zapasowych, odporność na wysychanie, czy o innej funkcji związanej z późniejszymi fazami rozwoju zarodka. Embriogeneza somatyczna stworzyła lepsze możliwości badania różnych genów związanych z wczesną embriogenezą, w tym także genów białek pozakomórkowych. Wykorzystując embriogenezę somatyczną wyizolowano także homologi genów istotnych w lepiej zbadanych procesach rozwojowych u odległych systematycznie gatunków i mających istotne znaczenie w embriogenezie.

*Summary.* The gene cloning techniques opened new possibilities in many research areas including plant embryogenesis that is now of great interest of many scientists using other methods in their experiments. Changes in gene expression patterns during embryogenesis are tested based on the model of zygotic embryo development or based on somatic embryogenesis in *in vitro* cultures. The first model, i.e. research on zygotic embryogenesis includes mainly analysis of numerous embryonic mutants. Here, there are many genes cloned and characterized coding for storage proteins and for proteins of desiccation resistance or others of function related to later stages of embryogenesis. The somatic embryogenesis gives the possibility to test genes related to early embryogenesis events, including genes of some extracellular proteins. There are also some genes isolated from somatic embryos showing the homology to genes important in developmental processes of evolutionary divergent species that are better characterized.

## 1. WSTĘP

Po zapłodnieniu lub od chwili, gdy komórka somatyczna czy gametofit męski wchodzi na szlak embriogenezy, proces rozwojowy zarodka wynika z czasowo zróżnicowanej ekspresji genów. Od czasu gdy narzędzia biologii molekularnej znalazły się powszechnie w użyciu, zbadanie tego procesu stało się wyzwaniem dla biologów roślin. Ostatnio pojawia się coraz więcej prac rozpatrujących genetyczne i molekularne aspekty embriogenezy [19,42,46,48]. Celem niniejszej pracy jest pokazanie aktualnej sytuacji w zakresie izolacji i molekularnej charakterystyki genów biorących udział w zygotycznej i somatycznej embriogenezie.

Według Raghavana [36] aktywacja genów podczas przejścia komórki somatycznej w zarodek jest odmienna od zachodzącej po zapłodnieniu, szczególnie jeśli chodzi o początkowe etapy tego procesu. Ponadto metodyka konieczna do zapoczątkowania badań w tych dwu systemach, jak i materiał wyjściowy znacznie się różnią. W niniejszym opracowaniu molekularne mechanizmy embriogenezy zostaną omówione oddzielnie dla embriogenezy zygotycznej i somatycznej. W wielu wypadkach wyniki molekularnych badań nad somatyczną embriogenezą są później potwierdzane w układzie embriogenezy zygotycznej. Stwarza to wspólną platformę w interpretacji wyników badań na obydwu modelach.

## 2. EMBRIOGENEZA ZYGOTYCZNA

### 2.1. ROLA INFORMACJI MATECZNEJ

Na podstawie eksperymentów w układach zwierzęcych, takich jak jeżowiec czy niektóre płazy, powszechnie akceptowane jest istnienie informacji matrycowej w komórce jajowej (mateczne mRNA), poza jądrowym DNA, która służy do syntezy białek bezpośrednio po zapłodnieniu [36]. Niewiele wprawdzie wiadomo na temat roślin wyższych, jednak prace Nagato [32] wskazują na podobieństwo pod tym względem do organizmów zwierzęcych. Otóż kłosa jęczmienia wyłożone na pożywkę z  $^3\text{H}$ -urydyną nie wykazały autoradiograficznie wykrywalnego włączania znakowanego związku aż do stadium około stu komórek (czyli po stadium globularnym). Jednocześnie śledząc inkorporację  $^3\text{H}$ -leucyny nie zaobserwowano ograniczenia syntezy białek. Wiedząc, że komórki jajowe były zapładniane po wyłożeniu kłosów na pożywkę i że komórki zarodka globularnego nie mają dużych zapasów urydyny, można stwierdzić, że pierwsze białka zarodka są kodowane na zgromadzonym mRNA matki. Meinke [31] podkreśla jednak mniejsze znaczenie matecznego mRNA w embriogenezie układów roślinnych w porównaniu ze zwierzętami, ze względu na możliwość indukcji embriogenezy z mikrospor czy komórek somatycznych.

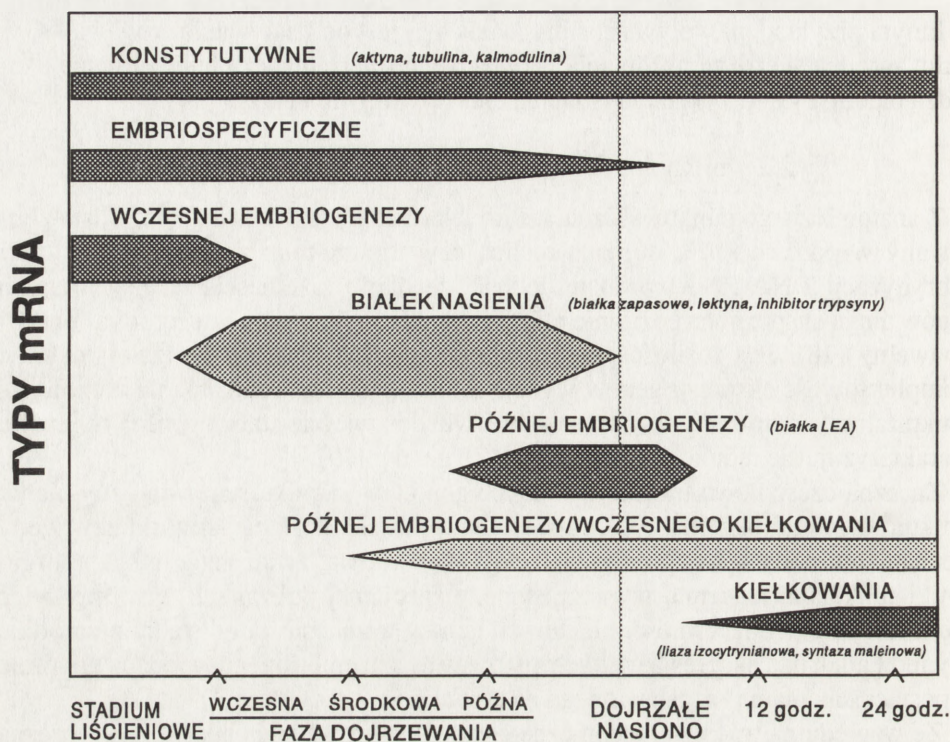
Innym przykładem wpływu rośliny matecznej jest oddziaływanie środowiska, w jakim zarodek się rozwija. Mutacja *shrunken endosperm* u jęczmienia głównie uszkadza bielmo i jest przykładem istnienia efektu rośliny matecznej [14].

## 2.2 mRNA SYNTETYZOWANE *DE NOVO*

Z anatomicznego punktu widzenia, zarodek roślinny jest stosunkowo prosto zbudowany w porównaniu z dojrzałą rośliną czy z zarodkiem zwierzęcym. Wyniki hybrydyzacji DNA-RNA wskazują jednak, że około kilkanaście tysięcy różnych genów ulega ekspresji na poziomie mRNA w stadium liścieniowym zarodka soi [20] i bawełny [18]. Jest to ilość przybliżona do obserwowanej w dojrzałej roślinie. Kompleksowość ekspresji genów wydaje się nie być proporcjonalna do złożoności strukturalnej, a tym samym w przeciwieństwie do zwierząt embriogeneza roślin nie charakteryzuje się redukcją ilości aktywnych genów [19].

Znaczną część nowo transkrybowanych genów w zarodku stanowią geny białek strukturalnych i funkcjonalnych, zapewniających stałe działanie komórki, tzw. geny mechanizmu podstawowego. Specjalizacja komórkowa, związana z inicjacją organów i funkcjami nasienia, wymaga syntezy specjalnej puli białek. Powinny więc zachodzić zmiany aktywności niektórych genów w zależności od stadium zarodka. Wyniki badań nad ekspresją różnych genów w czasie embriogenezy można uogólnić w postaci schematu przedstawionego na rysunku 1.

Ze względu na trudności techniczne ciężko jest prowadzić badania nad wczesną embriogenezą zygotyczną i niewiele wiadomo na ten temat. Pomocne okazuje się zjawisko somatycznej embriogenezy, które omówione zostanie w drugiej części pracy. Przeważająca część dostępnych danych dotyczy molekularnej charakterystyki późniejszych stadiów zarodka. Goldberg i in. [20] porównywali u soi grupy rzadkich mRNA w stadium liścieniowym (30 dpz = dni po zapłodnieniu), w "półdojrzałych" zarodkach (75 dpz) i w dojrzałym zarodku w stanie spoczynku (125 dpz). Porównania te dotyczyły głównie genów aktywnych podczas wzrostu liścieni, gdyż większość komórek zarodka w wymienionych stadiach wchodzi w skład liścieni. Ponad 90% z 15000 różnych mRNA obecnych w "półdojrzałym zarodku" jest wykrywalne w stadium liścieniowym i w dojrzałym zarodku. Co więcej, większość z nich jest obecna po kiełkowaniu w liścieniach i w liściach. Dane te wykazują, że tylko niewiele jakościowych zmian w składzie mRNA zachodzi w liścieniach podczas dojrzewania zarodka. Większość rodzajów mRNA jest przechowywana w dojrzałym zarodku i jest obecna później w roślinie. Przypuszczalnie więc, niewiele rodzajów transkryptów jest specyficzne dla zarodków lub jest obecne w zarodkach w znacznie większej ilości niż w innych okresach rozwoju (rys. 1). Galau i Dure [18] szacują, że nie więcej niż sto różnych genów ulega w pełni specyficznej ekspresji w czasie embriogenezy. Dodatkowo, wyniki porównań produktów translacji *in vitro* mRNA z zarodków w różnym wieku do białek występujących *in vivo* [4] wskazują na przewagę regulacji



## EMBRIOGENEZA KIEŁKOWANIE

Rys. 1. Występowanie poszczególnych typów mRNA podczas embriogenezy i kiełkowania (prze-rysowane za [11]); grubość poszczególnych bloków jest proporcjonalna do intensywności wystę-powania; pokazano również orientacyjne czasy występowania typów mRNA

na poziomie transkrypcji w czasie embriogenezy nad późniejszymi możliwymi eta-pami regulacji.

### 2.3 MUTANTY ZARODKOWE JAKO OBIECUJĄCA PERSPEKTYWA IZOLACJI GENÓW KLUCZOWYCH DLA EMBRIOGENEZY

Genetyczną i molekularną analizę genów pełniących różne funkcje podczas em-briogenezy ułatwiają mutanty zarodkowe. Pod względem fenotypowym można je podzielić na:

- (1) zaburzenia wczesnych stadiów morfogenezy i podziałów komórkowych,
- (2) zmiany akumulacji barwników i materiałów zapasowych podczas dojrzewania nasienia oraz
- (3) zakłócenia w przygotowaniu do spoczynku i kiełkowania [31].

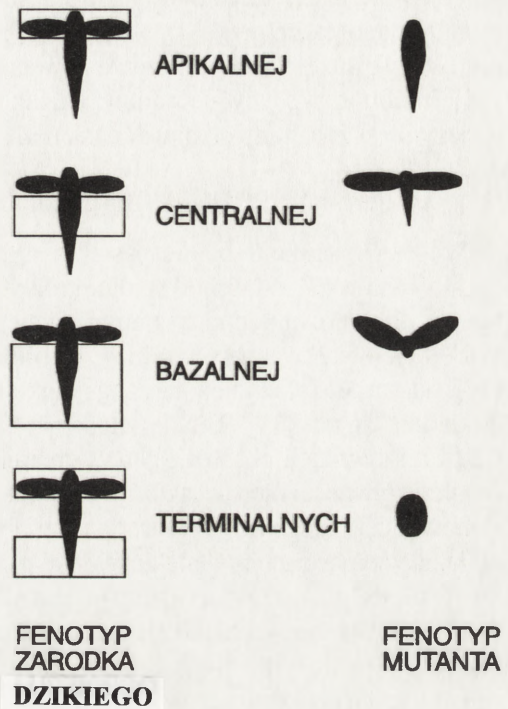
Większość z nich, z wyjątkiem genów niektórych białek zapasowych oraz białek LEA (ang. *late embryogenesis abundant*) jest nieznaną.

Najtrudniejsze z punktu widzenia technicznego, ale i bardzo interesujące są badania nad mutantami przejawiającymi swój efekt we wczesnych stadiach embriogenezy. Nadzieję na szersze zbadanie molekularnych aspektów embriogenezy budzą szeroko zakrojone prace nad mutantami rozwojowymi zarodków kukurydzy i rzodkiewnika. Ciekawą ich część stanowią mutanty z rozwojem zarodka zatrzymanym w określonym stadium. Otrzymano już kolekcje takich mutantów u kukurydzy używając transpozonów [6] oraz u rzodkiewnika przy pomocy T-DNA. Szczególnie obiecujące są mutanty rozwoju zarodka rzodkiewnika otrzymane przez mutagenезę EMS [30]. Te ostatnie obejmują kilka grup w zależności od fenotypu mutantu (rys. 2):

- (1) delecja części zarodka w osi apikalno-bazalnej,
- (2) zaburzenia struktury wzoru radialnego,
- (3) zmieniony kształt.

Identyfikacja i analiza tych mutacji może mieć przełomowe znaczenie w badaniach genetyczno-molekularnych uwarunkowań morfogenezy we wczesnych stadiach rozwoju zarodka. Jedną z mutacji genu *GNOM* zaburza asymetryczny podział zygoty [29]. Inne z otrzymanych mutacji dotyczą dalszych etapów tworzenia domen w osi apikalno-bazalnej (domena apikalna: liścienie, wierzchołek pędu, górna część hypocotyła; domena centralna: hypocotyl; domena bazalna: korzeń). Pozostałe z omawianych mutacji zakłócają organizację tkanek i kształtu zarodka. Na podstawie tych badań przypuszcza się, że około czterdzieści genów odpowiada za ustalenie i organizację anatomii zarodka [30]. Niestety, do tej pory żaden z powyższych genów nie został scharakteryzowany molekularnie, choć trwają intensywne prace w tym kierunku.

#### DELECJE CZĘŚCI ZARODKA:



Rys. 2. Rodzaje delecji we wzorze osiowym zarodka *Arabidopsis thaliana* powodowane przez mutacje (przerysowane za [30])

## 2.4. WCZESNA EMBRIOGENEZA

Jednym z przykładów wyraźnych zmian w ekspresji genów podczas wczesnej embriogenezy zygotycznej jest gen inhibitora trypsyny Kunitza u soi. mRNA tego genu pojawia się już w małej grupie komórek w mikropylarnej części zarodka globularnego, które przypuszczalnie są komórkami inicjalnymi merystemu i występuje w dość dużej ilości w obszarze powstawania merystemu w zarodku sercowatym, [34]. Inhibitor trypsyny nie stanowi jednak produktu swoistego dla wczesnej embriogenezy i jest zaliczany do białek nasienia.

## 2.5. EKSPRESJA BIAŁEK LEA I BIAŁEK NASIENIA

Według rysunku 1 białka nasienia są grupą, której obecność jest specyficznie regulowana w zależności od stadium rozwojowego zarodka. Są to dość powszechne białka akumulowane podczas embriogenezy i magazynowane w suchym nasieniu. Wśród nich białka zapasowe służą za źródło węgla i azotu dla kiełkującego nasienia [24], natomiast rola białek, takich jak lektyna czy inhibitor trypsyny, nie jest jeszcze dokładnie znana [19]. Białka zapasowe są z jednej strony dobrym modelem do śledzenia regulacji ekspresji genów roślinnych, a z drugiej ważnym ekonomicznie źródłem żywności i surowca dla przemysłu. W przybliżeniu mRNA kodujące te białka stanowi 50% całego mRNA zarodka "półdojrzałego" [20]. Goldberg i in. [19] wyróżniają następujące cechy białek nasienia:

- (1) określona, czasowa ekspresja genów kodujących te białka,
- (2) wysoka specyfika ich ekspresji, ograniczona wyłącznie do embriogenezy lub zaznaczająca się tylko nieznacznie w innych fazach,
- (3) regulacja przestrzenna ekspresji tych białek w różnych częściach zarodka (np. lektyna wykazuje wyższą ekspresję w liścieniach niż w osi zarodka).

Inną embriospecyficzną grupą są białka LEA (ang. *late embryogenesis abundant*). Ulegają one czasem ekspresji także w innych fazach rozwojowych rośliny jako reakcja na suszę i przypuszcza się, że spełniają funkcję ochronną w czasie utraty wody [12].

## 2.6. MECHANIZMY REGULACJI EKSPRESJI EMBRIOSPECYFICZNYCH BIAŁEK

Badania nad aktywnością genów kodujących białka nasienia prowadzone przez Wallinga i in. [45] wskazują, że regulacja ekspresji wielu z nich odbywa się na poziomie transkrypcji. Posttranskrypcyjna regulacja ma również miejsce. Dowodzą tego m.in. różnice w zawartości mRNA lektyny pomiędzy "półdojrzałym" zarodkiem a korzeniem dojrzałej rośliny wynoszące kilka rzędów wielkości więcej niż te same różnice w poziomie transkrypcji genu lektyny. Może to być wynikiem większej stabilności czy też efektywniejszego transportu do cytoplazmy w zarodku niż w roślinie.



Mechanizmy regulacji ekspresji różnych białek nasienia wydają się być wysoce konserwatywne. Świadczą o tym wyniki doświadczenia, w którym wkomponowano geny tych białek w pochodne plazmidu Ti, następnie transformowano rośliny przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens* i badano ich ekspresję w układach heterologicznych. Stwierdzono, że u transformantów tytoniu i petunii zostaje zachowana specyfika ekspresji genów takich gatunków, jak: soja, fasola, rzepak, jęczmień, pszenica i kukurydza [19](tab. 1). Przy pomocy delecyjnych pochodnych promotorów niektórych z tych genów zidentyfikowano rejony, a w niektórych przypadkach konkretne elementy odpowiedzialne za specyficzną ekspresję w zarodkach (tab. 1) [19,42]. Aktywność niektórych zarodkowych genów powiązано z ekspresją genów regulatorowych. Takimi regulatorami u kukurydzy są Opaque2 dla genów zein [25], C1 i R1 dla genów antocyjanin endospermu oraz Viviparous1, regulator dwóch poprzednich [22]. Ekspresja embriospecyficznych białek jest także zależna od ABA. Okazało się, że kwas abscyzynowy powoduje podwyższoną akumulację mRNA, niektórych białek LEA i zapasowych [35,38]. Podobnie jak i w promotorach genów kodujących białka nasion, tak i w niektórych genach *LEA* zidentyfikowano specyficzne elementy. Na przykład gen *Em* z pszenicy ma w promotorze element warunkujący ekspresję zależną od ABA i od czynnika transkrypcyjnego EMBP-1 [21].

### 3. EMBRIOGENEZA SOMATYCZNA

#### 3.1. MARCHEW JAKO MODELOWY UKŁAD DOŚWIADCZALNY

Notowany w ostatnich latach znaczący rozwój badań nad somatyczną embriogenezą spowodował także wzrost zainteresowania tym procesem jako modelem do badań zróżnicowanej ekspresji genów w czasie morfogenezy. Najszerzej stosowanym tutaj modelem jest somatyczna embriogeneza w zawiesinach komórkowych marchwi. Model ten polega na utrzymywaniu w stanie niezróżnicowanym zawiesiny składającej się z pojedynczych komórek i agregatów komórkowych w obecności 2,4-D. Usunięcie auksyny z pożywki powoduje indukcję rozwoju zarodków. Układ ten z dość prostym systemem sterowania, w którego wyniku można otrzymać embriogenezę z pojedynczej komórki somatycznej, wydaje się idealnym do badań biochemicznych i molekularnych. Badania aktywacji genów podczas somatycznej embriogenezy wydają się szczególnie przydatne w śledzeniu wczesnych efektów embriogenezy.

#### 3.2. PIERWSZE BIOCHEMICZNE MARKERY SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Pierwsze badania zmierzające do ogólnej charakterystyki genów ulegających ekspresji w tym układzie badawczym można przedstawić następująco (za Raghavanem [36]):

TABELA 1. Zestawienie różnych białek nasion (przerysowane z [19], zmodyfikowane)

Białko/gen	Gatunek	Specyfika ekspresji zachowana w układzie heterologicznym	Obszary promotora ważne dla specyfiki ekspresji
$\beta$ -konglicynina, podjednostka $\alpha'$ / <i>Cgy1</i>	soja	tytoń, petunia	+1 do -159
$\beta$ -konglicynina, podjednostka / <i>Cgy4</i>	soja	tytoń, petunia	?
lektyna/ <i>Le1</i>	soja	tytoń	+1 do -77
glicynina, podjednostka A <sub>1a</sub> B <sub>1b</sub> / <i>Gy1</i>	soja	tytoń	+1 do -66
inhibitor trypsyny Kunitza/ <i>Kti1</i>	soja	tytoń	?
inhibitor trypsyny Kunitza/ <i>Kti2</i>	soja	tytoń	?
inhibitor trypsyny Kunitza/ <i>Kti3</i>	soja	tytoń	?
vicilina	groch	?	?
legumina A/ <i>legA</i>	groch	tytoń	?
legumina B/ <i>legB</i>	fasola	tytoń	?
fitohemagglutynina, podj. <i>L1dlec2</i>	fasola	tytoń	+1 do -125
faseolina	fasola	tytoń	?
krucyferyna	rzepak	?	?
napina	rzepak	rzepak	+1 do -300
hordeina	jęczmień	tytoń	+37 do -512
glutenina, ciężki polipeptyd	pszenica	tytoń	-5 do -438
glutenina, lekki polipeptyd	pszenica	tytoń	-160 do -326
zeina, polipeptyd 19 kDa	kukurydza	petunia	?
zeina, polipeptyd ZA	kukurydza	tytoń	+1 do -549
HRGP ( <i>hydroxyproline-rich glycoprotein</i> )	kukurydza	?	?
HyPRP ( <i>hybrid proline-rich protein</i> )	kukurydza	?	?
heliantynina/ <i>HaG3-D</i>	slonecznik	tytoń	-322 do -725

1. Już w 6 godzin po przeniesieniu do pożywki bez auksyny następuje wzrost syntezy mRNA w porównaniu z zawiesiną rosnącą w obecności 2,4-D, jednocześnie jest obserwowane obniżenie stężenia wolnych aminokwasów w embriogenicznych liniach komórkowych.

2. Indukcja embriogenezy w zawiesinach marchwi na pożywce bez auksyny podlega regulacji na poziomach transkrypcyjnym i translacyjnym, ponieważ inhibitor poliadenylacji nie zatrzymuje syntezy białek, a rozwój zarodka zatrzymuje się w stadium globularnym. Innym możliwym wytłumaczeniem tego zjawiska jest determinacja molekularna rozwoju embrioidu już na pożywce z 2,4-D.

3. Zmianie ekspresji genów podczas somatycznej embriogenezy towarzyszą różne zmiany biochemiczne, takie jak:

(a) ponad dwukrotny wzrost stężenia putresceiny, spermidyny i sperminy w komórkach embriogenicznych w 24 godziny po usunięciu 2,4-D oraz wzrost aktywności dekarboksylazy argininowej i dekarboksylazy S-adenozylmetioniny, enzymów biorących udział na szlaku biosyntezy wymienionych poliamin (poliaminy mają zdolność wiązania grup kwasowych kwasów nukleinowych),

(b) różnice we wzorach elektroforetycznych izoenzymów, takich jak dehydrogenaza glutaminianowa i inne [2,13],

(c) wzrost względnej zawartości histonu H1 w stosunku do pozostałych białek histonowych w kulturze embriogenicznej,

(d) zmiany w elektroforetycznych obrazach białek szoku ciepłego,

(e) występowanie dwóch embriospecyficznych białek E1 i E2, pojawiających się w kilka godzin po indukcji somatycznej embriogenezy u marchwi [40,41]. Podobnie w innych układach doświadczalnych zaobserwowano zmiany na elektroforezogramach białek [15], choć częściowej ilościowe.

### 3.3. BIAŁKA LEA TAKŻE ULEGAJĄ EKSPRESJI PODCZAS SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Na końcu powyższego zestawienia wyników pierwszych badań biochemicznych aspektów somatycznej embriogenezy wymieniono obserwacje dotyczące zmiany w elektroforetycznych obrazach białek. Otóż badania białek stały się pomostem łączącym ze współczesną biologią molekularną. Ponieważ na początku embriogenezy brak jest znacznych zmian w różnorodności i intensywności syntezy białek, występują trudności w izolacji genów o specyficznej ekspresji we wczesnym rozwoju zarodka. Choi i in.[5] zastosowali metodę immunoadsorpcji do wzbogacania przeciwciał na ekstrakty z zarodków somatycznych. Stosując takie przeciwciała wyizolowano z biblioteki ekspresyjnej kłony cDNA o preferencyjnej ekspresji w czasie embriogenezy. Jeden z nich, *Dc8* kodował hydrofilne białko wykazujące podobieństwo do białek typu LEA [12]. Wzór ekspresji był podobny w zarodkach somatycznych i zygotycznych marchwi. Niski poziom transkryptu *Dc 8* stwierdzono w niezróżnicowanych kulturach komórkowych, natomiast podczas tworzenia zarodków globularnych następował wzrost jego zawartości. Produkt genu jest także obecny w dojrzałych zarodkach zygotycznych i w niewielkich ilościach w bielmie marchwi. Pomimo obecności już we wczesnych etapach embriogenezy przypuszcza się, że białko *Dc8* pełni rolę podczas odwadniania nasion, podobnie jak inne białka LEA [3,17]. Ekspresja innego genu marchwi, *Dc59*, badanego jednocześnie z *Dc8*, jest także indukowana we wczesnej embriogenezie [5,23]. *Dc59* wykazuje homologię do białka błonowego ciałek tłuszczowych kukurydzy. Pomimo że mRNA dla *Dc8* i *Dc59* pojawiają się już w stadium globularnym, to ich obecność jest raczej skorelowana z późniejszym stadium sercowatym. Hormon 2,4-D, jeden z głównych czynników regulujących somatyczną embriogenezę marchwi, którego usunięcie z kultury prowadzi do rozwoju zarodków somatycznych, nie powoduje zahamowania ekspresji *Dc8* i *Dc59*. Inny regulator wzrostu, ABA, powoduje akumulację tylko mRNA *Dc59* w organach zarodkowych. Białkowe ekstrakty jądrowe z zarodków somatycznych wykazywały wiązanie do pięciu sekwencji (elementów) promotora *Dc59*, wskazując na możliwość regulacji ekspresji tego genu przez inne białka zarodka. Elementy te były homologiczne do występujących w obrębie promotora genu *Dc8*, którego fragmenty skutecznie

konkurują przy wiązaniu ekstraktów jądrowych przez sekwencje promotora Dc59 [23]. Ekspresja Dc8 i Dc59 występuje także w skiełkowanych zarodkach somatycznych w przeciwieństwie do siewek z nasion, co tłumaczy się brakiem okresu spoczynku, który zmieniałby całkowicie tory transkrypcji genów. Inny klon cDNA, Dc3, ulega także ekspresji podczas procesu somatycznej embriogenezy. Chociaż specyficzność ekspresji w masie proembriogenicznej i w zarodkach somatycznych nie jest całkowita, to wyraźny jest jej wzrost już we wczesnych etapach po indukcji. Obecność transkryptu Dc 3 już w nieodróżnianej kulturze marchwi, przy obecności 2,4-D, sugerować może wczesną indukcję embriospecyficznego genu związaną z nabyciem potencjału embriogenicznego [47,37]. Przewidywana sekwencja aminokwasów białka Dc3 (na podstawie sekwencji DNA), wykazuje podobieństwo do białek typu LEA, tak jak Dc8. Seffens i in. [37] zaliczają gen Dc3 do grupy RED (*regulated environmentally-developmental*). Są to geny, które w fizjologicznie normalnych warunkach ulegają ekspresji w sposób zgodny z fazami rozwoju i mogą być określane jako tkankowo lub procesowo specyficzne. Jednak w nienormalnych warunkach, jak np. stres środowiskowy, geny RED mogą ulegać aktywacji w tych tkankach czy w fazach rozwojowych, w których normalnie nie są aktywne. Do nich właśnie zalicza się geny LEA. Dc3 ulega indukcji w warunkach deficytu wodnego i pod wpływem ABA.

### 3.4. BIAŁKA POZAKOMÓRKOWE

Pewną częścią badań nad somatyczną embriogenezą na poziomie molekularnym są prace nad czynnikami ulegającymi sekrecji do pożywki w kulturach zawieszonych. Czynniki te wywołują między innymi zjawisko zwane kondycjonowaniem pożywki. Są to głównie pochodzące ze ściany komórkowej polisacharydy, proteoglikany i polipeptydy [43]. Wśród tych ostatnich dużą część stanowią enzymy, takie jak oksydoreduktazy (np. peroksydazy) i hydrolazy (np. glikozydazy, endoglikanazy). Peroksydazy z kolei biorą udział w wiązaniu (usieciowieniu) komponentów ściany komórkowej i przypuszcza się, że wpływają na ekspansję komórek. Glikozydazy natomiast, rozkładają polimery ściany pierwotnej i blaszki środkowej, które utrzymują komórki roślinne w zespoleniu. Prowadzone są badania nad kilkoma pozakomórkowymi białkami marchwi EP1, EP2 i EP3 [44,39,8]. EP1 wydzielane jest przez kultury nieembriogeniczne i jest strukturalnie podobne do glikoprotein S z rzepaku i rzodkiewnika [33]. W roślinach mRNA tego białka gromadzi się w wewnętrznych i zewnętrznych osłonkach załążka [44]. Białko EP2 jest wytwarzane przez komórki embriogenne i somatyczne zarodki, wierzchołki pędów siewek, rozwijające się kwiaty i dojrzałe nasiona. Klon cDNA dla EP2 wyizolowano z biblioteki ekspresyjnej przy pomocy przeciwciał na EP2, a jego sekwencja wykazuje podobieństwo do białka transportu lipidów. Ekspresja genu jest zlokalizowana w protodermie zarodków somatycznych i zygotycznych oraz przejściowo w epidermie primordiów liściowych i organów kwiatowych. Podejrzewa się, że EP2 bierze udział w transporcie monomerów kutyny do miejsca syntezy [39]. Klon cDNA dla białka EP3 nie został wyizolo-

wany, ale otrzymano częściową sekwencję aminokwasów i zidentyfikowano ją jako kwaśną endochitynazę występującą w formie zglikozylowanej [8]. Białko EP3 jest zdolne do odtworzenia normalnego rozwoju zarodków mutantu *ts11* (wrażliwego na podwyższoną temperaturę), zatrzymujących swój rozwój w podwyższonej temperaturze na stadium preglobularnym. Zaburzenia rozwoju zarodków tego mutantu przejawiają się między innymi nienormalnym rozwojem protodermy i brakiem ekspresji EP2. Zaskakujące jest spostrzeżenie, że u mutantu *ts11*, podobny efekt jak EP3 ma czynnik nodulacji (*Nod*) będący lipooligocukrem z *Rhizobium* [9]. Sugeruje to możliwość udziału endochitynazy w tworzeniu roślinnych analogów czynników *Nod*.

### 3.5. INNE MOLEKULARNE MARKERY SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Aleith i Richter [1] szukali genów ulegających ekspresji w pierwszych dniach po indukcji embriogenezy w kulturach zawieszinowych marchwi poprzez przeglądanie różnicowe biblioteki skonstruowanej z mRNA kultury w 8 dni po usunięciu 2,4-D (indukcja). Dużą część wyizolowanych klonów stanowiły geny ulegające przejściowej ekspresji, której maksimum następowało 8 dni po indukcji. Analiza sekwencji wykazała, że klon *DC2.15* koduje białko zawierające domenę bogatą w prolinę i rejony podobne do punktów przyczepiania do błony. Klon *Dc7.1* koduje małe białko zawierające segmenty bogate w glicynę i histydynę. Klon *Dc9.1*, którego poziom ekspresji cechuje się radykalnym spadkiem po indukcji, koduje również białko błonowe o nieznannej funkcji.

Próbowano także wyizolować geny indukowane w somatycznej embriogenezie u *Medicago sativa*. Wśród sklonowanych genów są klony *MsPRP1* i *MsCa1*. *MsPRP1* koduje bogate w prolinę białko ściany komórkowej pojawiające się 1–3 dni po indukcji, ale nieobecne w zarodkach somatycznych. *MsCa1* to białko, którego poziom wzrasta po indukcji i ekspresja preferencyjnie zachodzi we wczesnym stadium globularnym. Przypuszczalnie jest to białko wiążące wapń. Innym genem, preferencyjnie ulegającym ekspresji we wczesnych stadiach embriogenezy u lucerny, jest *Mshsp18*, klon kodujący białko szoku cieplnego [10]. Wiele spośród białek szoku cieplnego pełni rolę molekularnych chaperonów, a ich elektroforetyczne obrazy ulegają zmianom podczas embriogenezy. Można więc przypuszczać, że zmianie programu rozwojowego, następującego w czasie inicjacji somatycznej embriogenezy, towarzyszy aktywność białek zapewniających właściwą konformację innych białek wymaganych w tym procesie.

Komamine i in. [26] wyizolowali szereg embriospecyficznch klonów z synchronizowanej kultury zawieszinowej marchwi. Klon *CAR4*, którego mRNA występowało głównie w stadium sercowatym i torpedo, wykazywał podobieństwo do bogatych w prolinę białek ściany komórkowej. Inny charakteryzowany przez tę grupę klon *CAR1*, wykazywał podobieństwo do czynnika wydłużania łańcucha białkowego EF1, a jego transkrypt wykrywalny był głównie przed i w stadium globularnym i później, co

najprawdopodobniej jest związane ze wzmożoną aktywnością podziałową komórek podczas embriogenezy [26].

Embriogeneza implikuje, rzecz jasna, bardzo wiele zmian ilościowych w ekspresji genów mechanizmu podstawowego. Przykładem mogą być zmiany ekspresji genów tubulin w czasie somatycznej embriogenezy marchwi, która wzrasta aż pięciokrotnie pomiędzy stadium globularnym i torpedo. Wiąże się to bezpośrednio ze wzrostem rozmiarów komórek w późniejszych stadiach embriogenezy [7].

### 3.6. GENY HOMEOTYCZNE W SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZIE

Ostatnio, rozpowszechnia się pogląd o podobieństwie podstawowych procesów rozwojowych i biorących w nich udział czynników białkowych pomiędzy wieloma, nawet bardzo odległymi ewolucyjnie gatunkami. Prostym sposobem poszukiwania i izolacji genów mogących odgrywać kluczową rolę w somatycznej embriogenezie jest więc poszukiwanie homologów genów decydujących o rozwoju w innych układach eksperymentalnych. Należą do nich na przykład homologi homeotycznych genów typu MADS-box, kodujących regulatory transkrypcji odpowiedzialne za morfogenezę kwiatu, o domenie funkcyjnej zakonserwowanej także w czynnikach transkrypcyjnych występujących u człowieka i drożdży. Jeden z nich to gen *cuc1*, wyizolowany z ogórka, o ekspresji zawężonej do kalusa embriogenicznego, zawierającego młode struktury zarodkowe, oraz do owocu. W obrębie zarodka somatycznego transkrypt genu jest wykrywalny w zewnętrznej strefie części radykularnej stadium sercowatego [16]. Innym przykładem są klony wyizolowane z soi, których sekwencje aminokwasowe są homologiczne do czynników transkrypcyjnych, zawierających homeodome-  
nę. Geny homeotyczne zawierające *homeobox* wyizolowano już wcześniej z różnych organizmów, takich jak *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* oraz *Zea mays*, gdzie pełnią funkcję decydujących "przełączników" w rozwoju embrionalnym. Transkrypt klonu *Sbhl* jest obecny we wczesnych stadiach somatycznych zarodków, jego poziom wzrasta do momentu uformowania liścieni, po czym maleje. *Sbhl* jest także bardzo słabo wykrywalny w łodygach i w hypokotylach [28].

### 3.7. ROLA METYLACJI

Nieco danych o różnicowanej ekspresji genów w czasie somatycznej embriogenezy pochodzi także z badań nad metylacją DNA. W wyniku indukcji embriogenezy poziom 5-metylo-cytozyny gwałtownie się obniża, aby w późniejszych stadiach wzrosnąć [27]. Powyższe zjawisko potwierdzone zostało na przykładzie dwóch genomowych klonów marchwi, z których jeden nie ulegał ekspresji w zarodkach somatycznych w porównaniu z zawiesiną i siewkami, gdzie w DNA było więcej miejsc dostępnych dla enzymu restrykcyjnego *MspI*, wrażliwego na metylację.

## 4. PIŚMIENNICTWO

- [1] ALEITH F, RICHTER G. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta* 1990; **183**: 17–24.
- [2] BAPAT S A, RAWAL S K, MASCARENHAS A F. Isozyme profiles during ontogeny of somatic embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 1992; **82**: 235–242.
- [3] BORKIRD C, CHOI J H, JIN Z H, FRANZ G, HATZOPOULOS P, CHORNEAU R, BONAS U, PELEGRI F, SUNG Z R. Developmental regulation of embryogenic genes in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6399–6403.
- [4] CHLAN C A, DURE L III. Plant seed embryogenesis as a tool for molecular biology. *Mol Cell Biochem* 1983; **55**: 5–15.
- [5] CHOI J H, LIU L, BORKIRD V, SUNG Z R. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1906–1910.
- [6] CLARK J K, SHERIDAN W F. Isolation and characterisation of 51 *embryo-specific* mutations of maize. *Plant Cell* 1991; **3**: 935–951.
- [7] CYR R J, BUSTOS M M, GUILTINAN M J, FOSKET D E. Developmental modulation of tubulin protein and mRNA levels during somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Planta* 1987; **171**: 365–376.
- [8] DEJONG A J, CORDEWENER J, LOSCHIAVO F, TERZI M, VANDEKERCKHOVE J, VANKAMMEN A, DEVRIES S C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 1992; **4**: 425–433.
- [9] DEJONG A J, HEIDSTRA L, SPAINK H P, HARTOG M V, MEIJER E A, HENDRIKS T, LOSCHIAVO F, TERZI M, BISSELING T, VANKAMMEN A, DEVRIES S C. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* 1993; **5**: 615–620.
- [10] DUDITS D, BERGE L, GYORGYEY J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 475–484.
- [11] DURE L. Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 1985; **2**: 179–197.
- [12] DURE L III, CROUCH M, HARADA J, HO T-H D, MUNDY J, QUATRANOS S, THOMAS T, SUNG Z R. Common amino acid sequence domains among the *lea* proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 1989; **12**: 475–486.
- [13] EVERETT N P, WACH M J, ASHWORTH D J. Biochemical markers of embryogenesis in tissue culture of maize inbred B73. *Plant Science* 1985; **41**: 133–140.
- [14] FELKER F C, PETERSON D M, NELSON O E. Anatomy of immature grains of eight maternal effect shrunken endosperm barley mutants. *Am J Bot* 1985; **72**: 248–256.
- [15] FILIPECKI M K, PRZYBECKI Z. Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genet Polon* 1994; **35(1–2)**: 1–9.
- [16] FILIPECKI M K, SOMMER H, MALEPSZY S. Molekularna charakterystyka genów aktywnych w procesie somatycznej embriogenezy u ogórka. I Warsztaty fizjologii i biochemii roślin. Toruń 15–16.03.1993. *Streszczenia referatów i plakatów*. (Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń) 1993; 60–61.
- [17] FRANZ G, HATZOPOULOS P, JONES T J, KRAUSS M, SUNG Z R. Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, *Dc8*, from *Daucus carota* L. *Mol Gen Genet* 1989; **218**: 143–151.
- [18] GALAU G A, DURE L. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger RNA populations as shown by reciprocal heterologous complementary DNA/mRNA hybridization. *Biochemistry* 1981; **20**: 4169–4178.
- [19] GOLDBERG R B, BARKER S J, PEREZ-GRAU L. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 1989; **56**: 149–160.

- [20] GOLDBERGR B, HOSCHEK G, TAM S H, DITTA G S, BREIDENBACH R W. Abundance, diversity, and regulation of mRNA sequence sets in soybean embryogenesis. *Dev Biol* 1981; **83**: 201–217.
- [21] GUILTINAN M J, MARCOTTE W R, QUATRANO R S. A leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 1990; **250**: 267–270.
- [22] HATTORI T, VASIL V, ROSENKRANS L, HANNAH L C, MCCARTY D R, VASIL I K (1992) The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *CI* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes & Dev* **6**: 609–618.
- [23] HATZOPOULOS P, FRANZ G, CHOY L, SUNG Z R (1990) Interaction of nuclear factors with upstream sequences of a lipid body membrane protein gene from carrot. *Plant Cell* **2**: 457–467
- [24] HIGGINS T J V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 191–221.
- [25] KODRZYCKI R, BOSTON R S, LARKINS B A. The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* 1989; **1**: 105–114.
- [26] KOMAMINE A, KAWAHARA R, MATSUMOTO M, SUNABORIS, TOYA T, FUJIWARA A, TSUKAHARA M, SMITH J, ITO M, FUKUDA H, NOMURA K, FUJIMURA T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; **28P**: 11–14.
- [27] LOSCHIAVO F, PITTO L, GIULIANO G, TORTI G, NUTI-RONCHI V, MARAZZITI D, VERGARA R, ORSELLI S, TERZI M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 325–331.
- [28] MA H, MCMULLEN M D, FINER J J. Identification of homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 465–473.
- [29] MAYER U, BUTTNER G, JURGENS G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 1993; **117**: 149–162.
- [30] MAYER U, TORRES-RUIZ R A, BERLETH T, MISERA S, JURGENS G. Mutations affecting body organisation in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 1991; **353**: 402–407.
- [31] MEINKE D W. Perspectives on genetic analysis of plant embryogenesis. *Plant Cell* 1991; **3**: 857–866.
- [32] NAGATO Y. Incorporation of <sup>3</sup>H-uridine and <sup>3</sup>H-leucine during early embryogenesis of rice and barley in caryopsis culture. *Plant Cell Physiol* 1979; **20**: 765–773.
- [33] NASRALLAH J B, NASRALLAH M E. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 1993; **5**: 1325–1335.
- [34] PEREZ-GRAUL, GOLDBERGR B. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. *Plant Cell* 1989; **1**: 1095–1109.
- [35] QUATRANO R S. Regulation of gene expression by abscisic acid during angiosperm embryo development. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 1986; **3**: 467–476.
- [36] RAGHAVAN V. Embryogenesis in angiosperms (Cambridge University Press, Cambridge) 1986.
- [37] SEFFENS W S, ALMOGUERA C, WILDE H D, VONDER HAAR R A, THOMAS T L. Molecular analysis of a phylogenetically conserved carrot gene: Developmental and environmental regulation. *Dev Genet* 1990; **11**: 65–76.
- [38] SKRIVER K, MUNDY J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 1990; **2**: 503–512.
- [39] STERK P, BOOIJ H, SCHELLEKENS G A, VANKAMMEN A, DEVRIES S C. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 1991; **3**: 907–921.
- [40] SUNG Z R, OKIMOTO R. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3683–3687.



- [41] SUNG Z R, OKIMOTO R. Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2661–2665.
- [42] THOMAS T L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. *Plant Cell* 1993; **5**: 1401–1410.
- [43] VANENGELEN F A, DEVRIES S C. Extracellular proteins in plant embryogenesis. *TIG* 1992; **8**: 66–70.
- [44] VANENGELEN F A, HARTOG M V, THOMAS T L, TAYLOR A, STURM A, VANKAMMEN A, DEVRIES S C. The carrot secreted glycoprotein gene EP1 is expressed in epidermis and has sequence homology to *Brassica* S-locus glycoproteins. *Plant J* 1993;
- [45] WALLING L, DREWS G N, GOLDBERG R G. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2123–2127.
- [46] WEST M A L, HARADA J J. Embryogenesis in higher plants: An overview. *Plant Cell* 1993; **5**: 1361–1369.
- [47] WILDE H D, NELSON W S, BOOIJ H, DEVRIES S C, THOMAS T L. Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* 1988; **176**: 205–211.
- [48] ZIMMERMAN J L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 1411–1423.

M. K. Filipecki, T. Wróblewski, S. Malepszy  
02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166



## ROŚLINY POWSTAŁE DROGĄ SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Zbigniew PRZYBECKI,

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych SGGW w Warszawie

### WSTĘP

Odpowiedź na pytanie, jaka jest wartość i czym są rośliny powstałe drogą somatycznej embriogenezy, jest ważna nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale jest tym pilniejsza, im bardziej rozwija się biotechnologia roślin. Regeneracja tą drogą ma coraz większe znaczenie szczególnie tam, gdzie konieczne jest masowe pozyskiwanie roślin np.: w przypadku klonowania na dużą skalę roślin, kiedy rozmnażanie generatywne nie jest możliwe, przy produkcji somatycznych nasion lub do otrzymywania roślin o nowych cechach. W związku z tym zależnie od celu, populacja roślin po regeneracji powinna mieć takie same właściwości lub zawierać osobniki o nowych cechach. Wobec tego wyłania się pytanie, czy możliwe jest sterowanie tym procesem tak, aby kultura embriogenna była wolna od zmian lub "generowała" dużą lub małą zmienność wśród regenerantów.

Przy produkcji roślin przez somatyczną embriogenezę, oprócz odpowiedniego składu genetycznego (najczęściej wymagany jest identyczny ze składem genetycznym dawcy eksplantatu) rośliny te powinny charakteryzować się również dużym podobieństwem fenotypowym do fenotypu wyjściowego. Regeneracja *in vitro* często wywołuje bowiem dodatkową zmienność, która jest zmiennością przejściową i najczęściej po jednym, dwóch pokoleniach zanika. Jednakże zaciemnia ona obraz zmienności genetycznej, a jest zupełnie nie do przyjęcia przy reprodukcji w celach komercyjnych. Efektem następczym kultury jest również pewien brak zahartowania roślin uniemożliwiający bezpośrednie wysadzanie regenerantów do szklarni czy gruntu. Zregenerowane rośliny wymagają hartowania, ponieważ warunki kultury

inaczej kształtują wiele właściwości, m.in. skórka może nie mieć kutykuli, miękisz gąbczasty może być nadmiernie rozwinięty. Przeniesienie takich roślin do surowszych warunków powoduje gwałtowne wyparowanie wody i utratę turgoru.

## FAKTY WYSTĘPOWANIA ZMIENNOŚCI SOMAKLONALNEJ W KULTURACH EMBRIOGENNYCH

Embriogeneza somatyczna przez długi czas była uważana przez badaczy za drogę rozwoju roślin z kultur *in vitro*, która nie wywołuje zmienności wśród regenerantów. Uważano, że zmienność somaklonalna występuje wśród roślin powstałych w drodze organogenezy. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy miał być fakt, że embriony somatyczne pochodzą od jednej komórki, natomiast rozwój organów inicjowany jest przez większą liczbę komórek [5, 21, 25]. Dowodząco też istnienia embriogennej selekcji. Feher i inni [8] znaleźli u lucerny niejasne korelacje między zmiennością liczby chromosomów i liczbą tworzonych embrioidów. Duża liczba normalnych roślin była otrzymywana wbrew dużej częstotliwości nienormalnych komórek. Również wśród komórek globularnych embrioidów izolowanych z kalusa było bardzo mało z nienormalnymi chromosomami. Stąd wniosek, że wystąpiła embrionalna selekcja faworyzująca komórki normalne. Siły selekcyjne mogą działać na różnych poziomach, wśród różnych gatunków roślin.

Wśród nowszych prac coraz częściej pojawiały się doniesienia, że populacje roślin uzyskanych drogą embriogenezy somatycznej nie są jednorodne, wobec tego kultury embriogenne generują zmienność. Linacero i Vasquez [11] wykazali, że u czterech odmian żyta zmienność występowała wśród roślin otrzymanych z kalusa embrionalnego zarówno drogą embriogenezy somatycznej, jak i organogenezy przynajmniej z taką samą częstotliwością, ale np.: formy albinotyczne występowały dwa razy częściej wśród roślin otrzymanych przez embriogenezę. Podobnie zmienność somaklonalną w potomstwie roślin regenerowanych przez embriogenezę somatyczną znaleźli Steen i inni [19] u buraka cukrowego, Damiani i inni [6] u *Lotus corniculatus*, Orton [16] u selera, Wang i Holl [23] u *Trifolium pratense*, Malepszy i Nadolska-Orczyk [12] u ogórków. Szczególnie dużo doniesień dowodzących istnienia większej lub mniejszej zmienności somaklonalnej wśród roślin uzyskanych drogą embriogenezy somatycznej ukazuje się ostatnio. Na samym tylko tegorocznym VIII Międzynarodowym Kongresie Roślinnych Kultur Tkankowych i Komórkowych we Florencji przynajmniej dziewięć doniesień było na ten temat. Jak powszechnie jest to zjawisko, dowodzi fakt, że zmienność somaklonalną znaleziono nawet po embriogenezie roślin iglastych [10] uznawanych za wyjątkowo stabilne w przypadku regeneracji tą drogą.

Zmienność ta jest również bardzo intensywnie badana na poziomie DNA, z wykorzystaniem technik RLFP i szczególnie dynamicznie rozwijających się technik opartych na amplifikacji DNA metodą PCR [1, 7, 10, 15, 21].

## CZYNNIKI MODULUJĄCE ZMIENNOŚĆ SOMAKLONALNĄ W KULTURACH EMBRIOGENNYCH

Bardzo interesujące wydają się wyniki badań nad zmiennością somaklonalną ogórków uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy. Malepszy i Nadolska-Orczyk [12] stwierdzili istnienie zmienności somaklonalnej w pokoleniu segregującym po embriogenie z kalusa uzyskanego z eksplantatów liściowych. Jednakże Pläder i inni [17] uzyskali drogą bezpośredniej embriogenezy z kultur małych skrawków z bardzo młodych liści regenerację bez zmienności. Badano pokolenia  $R_0$ , (pokolenie regenerantów)  $R_1$ , (pierwsze pokolenie segregujące – wyrosłe z nasion roślin  $R_0$ ) i  $R_2$  (drugie pokolenie segregujące). Nie było nawet przejściowych zmian w pokoleniu  $R_0$ , które zazwyczaj występują, chociażby jako efekt fizjologiczny kultury. Z drugiej jednak strony również drogą bezpośredniej embriogenezy, z kultury protoplastów otrzymanych ze szczególnie wysoce embriogenicznego kalusa żelowatego (GLC) i ustalonej embriogennej kultury zawiesinowej ogórków (EUKZ) w pokoleniu  $R_0$  nie uzyskano wprawdzie żadnych wariantów, ale za to w segregujących pokoleniach  $R_1$  i  $R_2$  90% roślin było zmienionych. Jest to obraz przypominający klasyczną mutagenezę, gdy pokolenie  $M_1$  (nie segregujące) jest na ogół nie zmienione (z wyjątkiem efektów somatycznych), a mutanty pojawiają się w  $M_2$ . Można by wobec tego sądzić, że wszystkie te zmiany są uwarunkowane przez allele recesywne.

Znaczenie tych rezultatów wynika również z tego, że mamy tutaj dwa przypadki bezpośredniej, somatycznej embriogenezy i w jednym zmienność jest bliska zeru (eksplantaty liściowe), mimo że tkanka nie jest jednorodna, a w drugim blisko 100% (protoplasty). Z drugiej strony z takich samych lub podobnych eksplantatów w zależności od rodzaju embriogenezy – pośredniej lub bezpośredniej uzyskano zmienność lub nie. Jednakże należy zauważyć, że w przypadku regeneracji z protoplastów embriogeneza była bezpośrednia, biorąc za punkt odniesienia protoplasty. Protoplasty te pochodziły natomiast z GLC (gel-like callus) i EUKZ, czyli z tkanki odróżnicowanej. Wobec tego w rzeczy samej była to embriogeneza pośrednia, a nie bezpośrednia, (biorąc za punkt odniesienia eksplantaty, z których otrzymano GLC i EUKZ) podobnie jak w przypadku kalusa liściowego. Jednakże częstotliwość zmian po kulturze protoplastów była znacznie większa. Wydaje się, że można to wytłumaczyć z jednej strony znacznie dłuższym okresem odróżnicowania i stanu kompetencji w przypadku protoplastów. Wiadomo, że sama długość fazy odróżnicowania zwiększa już prawdopodobieństwo zmian. Jednocześnie komórki te będąc w stanie embriogenym (kultura embriogenna) wykazują bardzo wielkość wrażliwość (są bardzo plastyczne co do kierunku rozwoju) na wszelkiego rodzaju bodźce. Wobec tego bardzo duża liczba operacji (szczególnie pozbawienie komórek ścian) i zmian środowiska koniecznych do otrzymania protoplastów i późniejszych etapów ma znaczny wpływ na ich zmienność. Doświadczenie to również dowodzi, że sam fakt rozwoju embrionów z pojedynczych komórek nie likwiduje zmienności somaklonalnej. Brak więc byłoby

tu presji selekcyjnej preferującej rozwój embrionów tylko z komórek bez mutacji. Z drugiej jednak strony gdyby nawet taka presja istniała, to mutanty pojawiły się dopiero w pokoleniu segregującym, co sugeruje, że mutacje te i tak nie miały wpływu na zdolność do embriogenezy, ponieważ były w stanie heterozygotycznym, a te które wywierały negatywny wpływ na rozwój zarodków somatycznych, zostałyby wyeliminowane. Isniałaby więc w takim przypadku selekcja fenotypów dzikich. Wydaje się, że dość częste są przypadki, że pokolenie  $R_0$  regenerantów powstałych w wyniku somatycznej embriogenezy nie wykazuje zmienności, co potwierdzałoby przedstawione wnioski. Morrish i inni [14] dopuszczają również pojawienie się mutacji dopiero w rozwijających się embrionach, co prowadziłoby do chimeryzacji. Nie wydaje się, aby takie zjawisko wystąpiło tutaj, ponieważ prawdopodobnie wystąpiłaby również zmienność po bezpośredniej embriogenezie ze skrawków liści. Obserwacja Morrisha jednak sugeruje możliwość wystąpienia form zmienionych nawet po rzeczywiście bezpośredniej embriogenezie (bezpośrednia embriogeneza z protoplastów była *quasi* bezpośrednia, jak wyżej przedstawiono). Dlaczego jednak nie wystąpiła zmienność wśród regenerantów powstałych drogą bezpośredniej embriogenezy ze skrawków bardzo młodych liści, które mają już komórki o różnej ploidalności. Jeżeli w takich liściach możliwa jest bezpośrednia embriogeneza, to znaczy, że istnieją tam komórki, które mają kompetencję embriogenną lub ją uzyskują bez potrzeby odróżnicowywania, co jest cechą charakterystyczną komórek, które zachowały cechy komórek embrionalnych, niedojrzałych. Ko mórki takie pod wpływem odpowiednich bodźców łatwo inicjują proces embriogenezy. Kompetentnymi są najczęściej komórki diploidalne (u form diploidalnych), natomiast komórki o innej ploidalności, będą już prawdopodobnie zróżnicowane i bez kompetencji. Ponieważ stworzone zostały warunki do inicjacji embriogenezy, a nie odróżnicowywania, komórki o wyższej ploidalności nie zapoczątkują embriogenezy. Im młodszy jest organ, tym komórek zdolnych do inicjacji embriogenezy jest więcej, wobec tego większa powinna być wydajność regeneracji. Tak więc z przedstawionych rezultatów wynika:

1. Wystąpienie zmienności somaklonalnej wśród roślin uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy zależy przede wszystkim od tego, czy regeneracja nastąpiła z odróżnicowanych wcześniej komórek czy nie. Z innych źródeł wiadomo, że również czas po odróżnicowaniu ma wpływ na częstotliwość zmian [9, 13, 14].

2. Na wystąpienie zmienności somaklonalnej badanych cech nie ma wpływu ilość komórek biorących udział w inicjacji embrionu.

Złożoność problemu zwiększają jeszcze takie czynniki, jak niekiedy trudności z rozróżnieniem między somatyczną embriogenezą a organogenezą. Bebeli i inni [3] regenerowali rośliny z niedojrzałych embrionów pięciu siostrzanych linii różniących się zawartością heterochromatyny telomerycznej. Linie te wykazały istotne różnice reakcji morfogenetycznej poczynając od niezróżnicowanych wolno rosnących kalusów produkujących mało pędów przez kultury organogeniczne z wysoką częstotliwością tworzenia pędów do kultur z bardzo wysoką częstotliwością somatycznej

embriogenezy. Analiza zmienności somaklonalnej w regenerowanych roślinach wykazała niejasny związek niestabilności i sposobu regeneracji. Linie z najłagodniejszą reakcją i regeneracją z niezróżnicowanych struktur były najstabilniejsze co do mutacji punktowych i chromosomalnych. Natomiast najbardziej embriogenne linie były średnio zmienne. Najbardziej niestabilne linie były organogeniczne [4]. Nie jest to jednak prawidłowość uniwersalna, ponieważ nie było takich prawidłowości np. u jęczmienia [18].

Inną możliwością sterowania zmiennością *in vitro* może być fakt wykrycia aktywności odwrotnej transkryptazy u *Nicotiana glauca* już po 24–48 godzinach od wyłóżenia eksplantatów [7]. Pojawiająca się odwrotna transkryptaza być może bierze udział w przejściowej amplifikacji DNA. Z komórek z aktywną transkryptazą wyizolowano zamplifikowane klony DNA wykazujące wysoki stopień homologii z retrotranspozonomem typu Copia. Dodatek azidotymidyny natychmiast zniósł aktywność rewertyazy.

Genetyczna stabilność w kulturach jest w dużym stopniu również warunkowana genotypowo [13, 14, 24]. Różnice między genotypami mogą być bardzo duże. Morrish i inni [14] badali zachowanie się dwóch linii izogenicznych, różniących się trzema cechami (dominująco dziedziczona purpurowa barwa pędów, dwie recesywnie dziedziczone, żółtej paskowatości i późnego kwitnienia – ta ostatnia sprzężona z barwą pędów). Jedna z tych linii była całkowicie stabilna przynajmniej do drugiego pokolenia ( $R_2$ ) rozszczepiającego się, druga natomiast po 12 miesiącach regeneracji dała około 0,02% roślin bez purpurowych pędów i 92% ! z deficycją chlorofilową (częstotliwość zmian w tej linii zależała też od czasu kultury). Takie różnice w indukowaniu zmienności między genotypami tłumaczy się architekturą genetyczną i wpływem stresu środowiskowego na stabilność genomu [2, 22].

## PODSUMOWANIE

Z przedstawionych faktów wyłania się obraz dość złożonych zależności między jakością (genotyp i fenotyp) roślin uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy a najrozmaitszymi czynnikami działającymi przed, w czasie i po kulturze. Tak więc do najważniejszych czynników zmniejszających zmienność somaklonalną w kulturach embriogenych można zaliczyć regenerację z jak najmniej zróżnicowanych komórek, tak aby nie było konieczności odróżnicowywania. Jest to chyba zasada najważniejsza. Jeżeli komórki muszą być odróżnicowane, to bardzo istotny jest czas kultury – im krótszy, tym mniejsza zmienność, oraz genotyp roślin dawców eksplantatów. Nie ma rezultatów jednoznacznych co do roli zdolności do regeneracji i selekcji podczas embriogenezy. Poznane są już pewne ogólne prawidłowości co do zależności między regeneracją przez somatyczną embriogenezę a zmiennością somaklonalną, jednak

precyzyjniejsze sterowanie tym procesem wymaga poznania zachowania się indywidualnych genotypów.

## LITERATURA

- [1] ARNHOLDT-SCHMITT B, NEUMAN K-H. Epigenetic variations in the genomic DNA of primary carrot tissue cultures. Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 123.
- [2] AMATO, D F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1986; **3**: 73–112.
- [3] BEBELI P, KARP A, KALTSIKES P.J. Plant regeneration from cultured immature embryos of sister lines of rye and triticale differing in their content of heterochromatin 1. Morphogenetic response. *TAG* 1988; **75**: 929–936.
- [4] BEBELI P, KARP A, KALTSIKES P.J. Somaclonal variation from cultured immature embryos of rye differing in heterochromatin content. 1990. *Genome*. **33**: 173–183.
- [5] BHOJAWANIS S. Somatic embryogenesis. [w] Plant cell culture, theory and practice. Rozdgar (red.) Elsevier 1983: 91–112.
- [6] DAMIANI F, MARIOTTI D, PEZZOTTI M, ARCIONI S. Variation among plants regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus* L. *Z Pflanzenzüchtung* 1985; **94**: 332–339.
- [7] DURANTE M, TADDEI S, FABBRI M, TOGNINI M, BERNARDI R. Reverse transcriptase activity during *in vitro* plant tissue cell dedifferentiation. Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 117.
- [8] FEHER F, TARCZY M H, BOCSA I, DUDIS D. Somaclonal chromosome variation in tetraploid alfalfa. *Pl Sci* **60**: 91–99.
- [9] FUKUI K. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *TAG* 1983; **65**: 225–230.
- [10] ISABEL N, LEVASSEUR C, BOIVIN R, BOUSQUET J, TREMBLAY F M. Evidence of genetic instability in somatic embryo-derived plantlets of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss. Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 126.
- [11] LINACERO R, VASQUEZ A M. Somaclonal variation in plants regenerated from embryo calluses in rye (*Secale cereale* L.). *Genet Manipul in Pl Breed* Walter de Gruyter and co Berlin N Y 1986: 479–481.
- [12] MALEPSZY S, NADOLSKA-ORCZYK A. *In vitro* culture of *Cucumis sativus*. VIII Variation in the progeny of phenotypically not altered R<sub>1</sub> plants. *Pl Breed* 1989; **102**: 66–72.
- [13] McCOY TJ, PHILLIPS R L, RINES HW. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. *Can J Genet Cytol* 1982.; **24**: 37–50.
- [14] MORRISH E M, HANNA W W, VASIL I K. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Penisetum glaucum* (L.) R. Br. (pearl millet). *TAG* 1990; **80**: 409–416.
- [15] NARAYANASWAMY P, THANGAVELU M, BAILEY T, TRUSKA M, MANTELL S H. Genetic variability studies in yams (*Dioscorea* ssp.) using RAPD markers: Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 119.
- [16] ORTON T J. Genetic instability during embryogenic cloning of celery. *Pl Cell Tissue Org Cult* 1985; **1**: 159–169.
- [17] PLÄDER W, BURZA W, MALEPSZY S. Relation between various regeneration systems and somaclonal variation by cucumber (*Cucumis sativus* L.). Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 116.



- [18] SINGH R J. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). *TAG* 1986; **72**: 710–716.
- [19] STEEN K, KEIMER B, HALUIN K D, PEDERSEN H C. Variability in plants of sugar (*Beta vulgaris* L) regenerated from callus cell-suspension and protoplasts Genet Manipul in Pl Breed Walter de Gruyter and co Berlin N Y 1986: 633–637.
- [20] TAYLOR P W J, FRASER T A, HIAN-LIEN KO, HENRY J R. RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. Abstr VIII Int Congr Pl Cell Cult Firenze, June 12–17, 1994: 119.
- [21] VASIL I K. Somatic embryogenesis and its consequences in gramineae. *Tissue Cult in Forest and Agric* Eds R.R.Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin and A. Hollaender 1985: 31–47.
- [22] WALBOT V, CULLIS C. Rapid genomic change in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 367–441
- [23] WANGH, HOLL FB. *In vitro* culture and the incidence of somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. *Pl Sci* 1988; **55**: 159–167.
- [24] ZEHR B E, WILLIAMS M E, DUNCAN D R, WIDHOLM J M. Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. *Can J Bot* **65**: 491–499.
- [25] ZENTKELER E. Wegetatywne rozmnażanie roślin metodą hodowli tkanek. [w] *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. M. Zentkeler (red.) PWN Warszawa 1984: 111–208.

Z. Przybecki

02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166

## KOMUNIKATY

### Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej postanowił przyznać nagrodę naukową w roku 1994 za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w latach 1992–1994 w czasopiśmie figurującym w Current Content. Wysokość nagrody w 1994 r. wyniesie 6 000 000 zł.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada 1994 r. pod adresem Fundacji.

*Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa  
tel. 340 344, fax 340470*

### Komunikat Redakcji "Postępów Biologii Komórki"

Redakcja "Postępów Biologii Komórki" pragnie kontynuować porządkowanie polskich mian z zakresu biologii komórki, a w szczególności miana dotyczące: morfologii komórek i ich funkcji oraz biologii molekularnej. W związku z tym prosimy o nadsyłanie na adres Redakcji propozycji mian do końca listopada każdego roku, aby można opublikować je w zeszycie 1 następnego roku. Wszystkie uwagi do propozycji, które nadejdą do Redakcji do końca września będą opublikowane w zeszycie 4 wraz z propozycją ostateczną mian. Po kilku latach na tej podstawie będzie można opublikować suplement "Postępów" zawierający przyjęte miana.

Układ nadsyłanych propozycji:

---

proponowane miano (nazwa) w j. polskim	odpowiednik w j. angielskim i synonimy	definicja, bliższy opis miana
--	--	-------------------------------------

---

*Redakcja*

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację. Prosimy uprzejmie o podawanie, w jakim edytorze została zapisana praca.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejny tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

## TREŚĆ

MALEPSZY S., WRÓBLEWSKI T.: Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka ogólna	1
WRÓBLEWSKI T. A.: Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka szczegółowa	11
FILIPECKI M. K., WRÓBLEWSKI T., MALEPSZY S.: Regulacja aktywności genów podczas embriogenezy u roślin	33
PRZYBECKI Z.: Rośliny powstałe drogą somatycznej embriogenezy	49

*Warunki prenumeraty kwartalnika*  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1995*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1995: dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

W 1993 r. zostały wydane dwa suplementy:

1. A. Klein – Peptydowe czynniki wzrostowe.
2. H. Gabryś (red.) – Postęp w badaniach ruchów komórek

W 1994 r. ukazał się oprócz niniejszego suplement nr 3:

3. Z. Żak (red.) – Biotechnologia – wybrane zagadnienia z inżynierii komórkowej, genetycznej i białkowej.

Cena pojedynczego suplementu 60 000 zł (płatne na konto Fundacji), dla prenumeratorów bezpłatnie.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:*

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

*Price per year 40 dollars USA.*

**Indeks 369705**