

Halina Kononowicz

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin  
Instytut Fizjologii i Cytologii  
Uniwersytet Łódzki  
Łódź

## Embriogeneza roślin *in vitro*

### I. Wstęp

Hodowlę komórek i tkanek roślinnych *in vitro* zaliczyć można do grupy technik (metod) ogólnie określanych terminem biotechnologia. Postęp jaki się w tej dziedzinie dokonał na przestrzeni ostatnich 10–15 lat stwarza nowe perspektywy dla szerokiego wykorzystania „na skalę przemysłową” metod opracowanych w laboratoriach biologicznych.

Regeneracja roślin *in vitro* odbywa się zazwyczaj drogą somatycznej embriogenezy lub organogenezy. Somatyczna embriogeneza jest procesem, poprzez który komórki diploidalne jak i haploidalne mogą podlegać różnicowaniu i tworzyć zarodki z pominięciem zapłodnienia i wytwarzania zygoty. Proces taki zachodzi także naturalnie (*in situ*) u szeregu gatunków, zarówno z komórek generatywnych, np. z komórek ośrodka, jak i tkanek somatycznych. Embriogeneza somatyczna zachodząca spontanicznie *in situ* jest przedstawiona w pracach przeglądowych (1–3).

W kulturach *in vitro* somatyczne zarodki, zwane też zarodkami dodatkowymi (*accessory embryos*), przybyszowymi (*adventive embryos*) lub embrioidami (*embryoids*) mogą powstawać z komórek kalusa, zawiesiny czy tkanek eksplantatu. Po raz pierwszy Reinert (1958), a następnie Steward (1963) wykazali somatyczną embriogenezę u marchwi (przeł. 18–20). Do 1979 r. zjawisko to opisane było dla 88 gatunków okrytozalążkowych reprezentujących 33 rodziny. Obecnie liczba ta wzrosła do 200 gatunków obejmujących zarówno rośliny okrytozalążkowe jak i nagozalążkowe. Listę gatunków, u których wykazano tę embriogenezę w warunkach *in vitro* przedstawili Tisserat i wsp. (2) oraz Rangaswamy (4).

Somatyczna embriogeneza, oprócz możliwości szybkiego namnażania roślin, umożliwia otrzymywanie roślin jednolitych genetycznie, a w konsekwencji morfologicznie, a także, w porównaniu z metodami tradycyjnymi jest stosunkowo tania.

Poza marchwią (*Daucus carota*), która jest najlepiej dotąd poznanym gatunkiem pod względem zdolności embriogennych *in vitro* (5,6,7), somatyczna embriogeneza *in vitro* była intensywnie badana u *Ranunculus sceleratus* (8,9), *Citrus* sp. (10,11), *Coffea* sp. (12,13) i *Theobroma cacao* (14,15,16).

Szczegółowe dane dotyczące somatycznej embriogenezy *in vitro* zawierają prace przeglądowe (17,18,13,19,20,4,21).

### II. Znaczenie doboru eksplantantu w indukcji somatycznej embriogenezy

Totipotencja komórek roślinnych nie jest ograniczona do tkanek merystematycznych. W przeciwieństwie do zwierząt, u których proces różnicowania jest zasadniczo nieodwracalny, w materiale roślinnym nawet zróżnicowane komórki mogą być przywrócone do stadium merystematycznego (22).

Somatyczna embriogeneza może być indukowana *in vitro* w hodowlach: 1) wegetatywnych komórek organów lub tkanek dojrzałych roślin; 2) tkanek generatywnych; 3) liścieni i hypokotyli zarodków.

Komórki embriogenne uzyskiwane były z różnego rodzaju eksplantatów, takich jak: fragmenty lodyg, siewki, wierzchołki pędów, pąki kwiatowe, a także ziarna pyłku czy gametofity (przełgl. 1). Wydaje się zatem, że proces embriogenezy *in vitro* można zainicjować z komórek każdej części rośliny.

Duże znaczenie dla uzyskania embriogennej kultury *in vitro* ma stadium rozwojowe tkanki czy organu, które stanowią źródło eksplantatu. Wykazano, że podczas rozwoju tkanek czy organów istnieje tylko krótki okres podczas którego posiadają one zdolności do tworzenia embriogennych kultur. Na tym specyficznym etapie rozwoju niektóre komórki eksplantatu pozostają w stanie merystematycznym i nie są przystosowane do pełnienia wyspecjalizowanych funkcji. Eksplantaty pobierane po lub przed tym okresem mogą nie posiadać zdolności formowania embriogenego kalusa.

Zazwyczaj kultury danego gatunku charakteryzują się zdolnością do jednego sposobu różnicowania, tj. embriogenezy lub organogenezy. Występowanie obu tych procesów w tej samej kulturze jest rzadko spotykane, chociaż zjawisko takie obserwowano w kulturach dyni (23). Mimo że tendencja do organogenezy lub embriogenezy jest cechą gatunkową, stwierdzono, że eksplantaty tytoniu lub uzyskany z nich kalus charakteryzowały się zdolnością do organogenezy *in vitro*, zaś izolowane protoplasty mezofilu rozwijały się w somatyczne zarodki (24).

Chociaż komórki kalusa dzielą się w sposób przypadkowy i nieorganizowany, totipotencja tych komórek umożliwia ich reorganizację w merystematyczne embriogenne struktury, które w wyniku dalszego rozwoju będą mogły tworzyć dorosłe rośliny (22).

### III. Drogi powstawania somatycznych zarodków *in vitro*

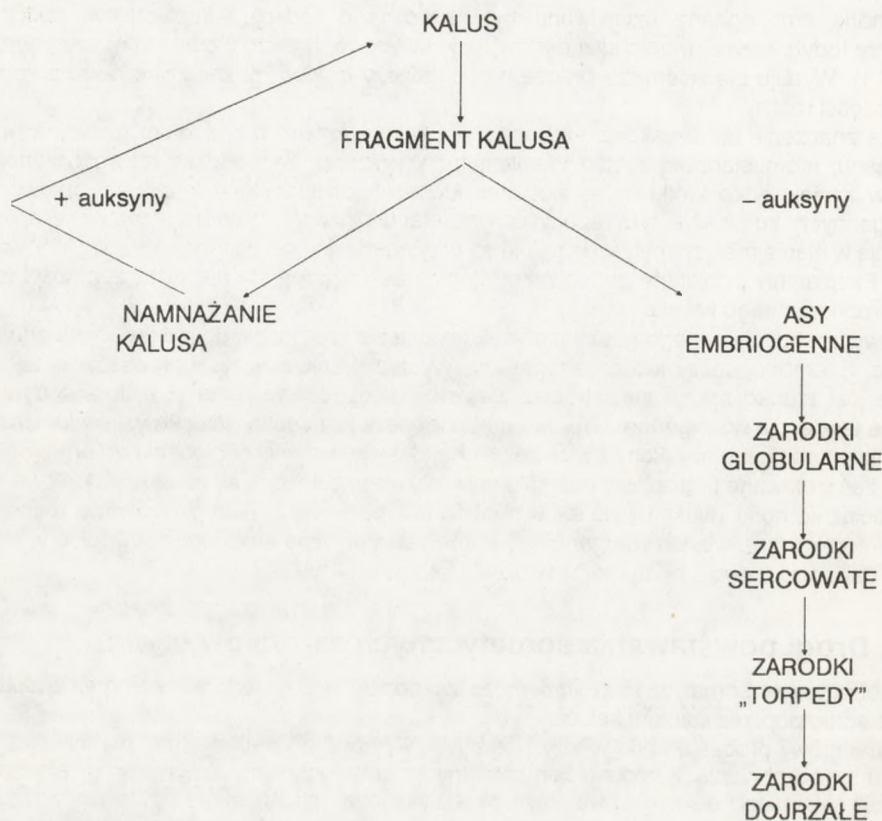
Embriogeneza somatyczna *in vitro* może zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio poprzez stadium kalusa.

Dwuetapowy proces embriogenezy pośredniej wymaga początkowo, dla namnażania masy kalusa i wyodrębnienia komórek kompetentnych embriogenne, obecności w stosunkowo wysokich stężeniach auksyn lub auksyn plus cytokininy. Następnie, różnicowanie zarodków z embriogennych komórek kalusa, zachodzi zazwyczaj na pożywkach nie zawierających auksyn lub takich, w których te regulatory wzrostu występują w niskich stężeniach. Dla inicjacji i namnażania embriogenego kalusa najczęściej stosowaną jest auksyna syntetyczna 2,4-D w stężeniach od 0,5 do 1,0 mg/l<sup>-1</sup>. Pożywki używane na pierwszym etapie nazywane są często pożywkami pierwotnymi lub indukującymi, natomiast pożywki warunkujące różnicowanie zarodków – pożywkami wtórnymi.

U *Theobroma cacao* somatyczna embriogeneza może zachodzić bezpośrednio z komórek epidermy hypokotyli lub liścieni zarodków, oraz pośrednio – poprzez stadium kalusa (15) (rys.1). Maksymalną intensywność embriogenezy można osiągnąć hodując embriogeny kalus na pożywkach zawierających w niewielkich stężeniach 2,4-D, tj. 10<sup>-2</sup>–10<sup>-3</sup> mg/l<sup>-1</sup> + 10% mleczka kokosowego (CW) (15). U tego gatunku somatyczne zarodki mogą rozwijać się także przy braku egzogennych hormonów, jednakże wówczas intensywność embriogenezy jest niewielka.

Zwraca uwagę morfologiczne zróżnicowanie embriogenego kalusa u różnych gatunków roślin. Tak np. u wielu traw i zbóż embriogeny kalus opisywany był jako zwarty i gładki, natomiast u innych okrytozalążkowych, m.in. u kakaowca, ten rodzaj kalusa jest sypki i charakteryzuje się „chropowatą” strukturą.

Badania cytologiczne wykazały (przełgl. 18–20), że kalusy nie mają budowy jednolitej i składają się z dwóch rodzajów komórek: centrum tkanki kalusa zajmują duże, starzejące się komórki parenchymatyczne, silnie zwakuolizowane, z cienką warstwą przyściennej cytoplazmy, małym jądrem i słabo barwiącym się jąderkiem. Natomiast, w powierzchniowych częściach masy kalusa zlokalizowane są małe, izodiametryczne komórki, charakteryzujące się gęstą cytoplazmą i dużym, centralnie położonym jądrem. Zawierają one niewielkie i nliczne wakuole



Rys.1. Schemat obrazujący embriogenezę *in vitro* kalusa kakaowca.

(niewidoczne w mikroskopie świetlnym), przez co wydają się niezakuolizowane. Komórki te odznaczają się wysoką aktywnością metaboliczną. Są one zdolne do podziałów i mogą tworzyć skupienia komórek o charakterze merystematycznym – w literaturze zwane są one merystemoidami, skupieniami merystematycznymi lub proembriogennymi masami. Jeśli te merystematyczne skupienia przeniesione zostaną na pożywki nie zawierające auksyn lub zawierające je jedynie w niewielkich stężeniach, mogą tworzyć zarodki.

Dwubiegunowe zróżnicowanie budowy (biegun wierzchołkowy i korzeniowy) przyjęto za kryterium uznania danych struktur za wczesne stadia rozwojowe zarodków.

Po utworzeniu stadiów globularnych, dalsze etapy rozwoju są zbliżone do opisywanych dla zarodków zygotycznych, tj. stadium sercowatego, torpedy i laski. U licznych gatunków obserwowano struktury przypominające wieszadelka, które łączą zarodki z macierzystą tkanką kalusa (6,15).

Powstające *in vitro* zarodki somatyczne niektórych gatunków wykazują pewne nietypowe cechy, nie występujące nigdy u zarodków zygotycznych, jak np. wielokrotne liścienie o nienormalnym rozwoju, oraz powstawanie zarodków przybyszowych z hypokotyli. W wielu przypadkach te anomalie mogą być eliminowane poprzez dodanie do pożywek ABA\* (25).

\* Stosowane skróty: ABA – kwas abscysynowy; 2,4-D – kwas dichlorofenoksyoctowy; CW – mleczko kokosowe; IAA – kwas 3-indoliloctowy.

Kolejne pasażowanie kalusa (przenoszenie na nowe pożywki) może powodować jego energizację (z j. ang. *habituation*) czyli utratę zależności od egzogennych hormonów. Zjawisko takie obserwowano np. w kalusie uzyskanym z ośrodka *Citrus sinensis* (26). Początkowo otrzymany kalus wymagał dla wzrostu i różnicowania embrionów obecności auksyn (IAA) i kinetyny. Kolejne pasażowanie kalusa powodowało jednak stopniowe obniżanie potencjału embriogennego i po 2 latach pojawiły się linie nie wymagające obecności egzogennych hormonów. W tych energizowanych tkankach hamowanie embriogenezy następowało już pod wpływem tak niskich stężeń hormonów jak  $0,001 \text{ mg/l}^{-1}$ . Z drugiej strony, traktowanie inhibitorami syntezy auksyn czy promieniami  $\gamma$ , które obniżają poziom endogennych auksyn, w znacznym stopniu stymulowało powstawanie embrionów (10,27,28). Podobne obserwacje poczyniono w badaniach nad embriogenezą u kakaowca (15). Po kilku latach hodowli w kulturach *in vitro*, somatyczne zarodki uzyskane drogą embriogenezy bezpośredniej z liścieni lub hypokotyli zarodków zygocytynych (tj. zarodków wyizolowanych z owoców kakaowca) tworzyły kalus. Wyizolowano 2 klony kalusa, które pasażowane na pożywki nie zawierające auksyn były zdolne do produkcji zarodków. Jednakże w tych warunkach proces embriogenezy przebiegał z niewielką częstotliwością, bowiem powstawały jedynie 1–2 zarodki na inokulum. Niskie stężenia 2,4-D ( $10^{-2}$  –  $10^{-3} \text{ mg/l}^{-1}$ ) znacznie stymulowały ten proces. Z drugiej strony, wyższe stężenia tej syntetycznej auksyny obniżały, a nawet całkowicie hamowały formowanie zarodków. Dodanie do pożywki  $1,0 \text{ mg/l}^{-1}$  2,4-D + 10% CW, powodowało całkowite zahamowanie procesu embriogenezy (15).

#### IV. Czynniki warunkujące somatyczną embriogenezę

Somatyczna embriogeneza *in vitro* indukowana była na pożywkach o zróżnicowanym składzie, jednak w ponad 70% przypadków uzyskania pozytywnych rezultatów (29) stosowana była pożywka Murashige i Skooga. Zawiera ona wyższe stężenia soli sodowych i potasowych niż pożywka White'a, oraz wysokie stężenia  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_3^-$ , których znaczenie w procesie inicjacji i rozwoju zarodków poznano już w latach sześćdziesiątych (przeł. 4, 18–20). Jednakże opinie dotyczące udziału egzogennej azotu w somatycznej embriogenezie są podzielone.

Obecność w pożywce zredukowanego azotu sprzyja powstawaniu wielokomórkowych agregatów i formowaniu zarodków. Natomiast, kiedy w podłożu znajdują się jedynie jony  $\text{NO}_3^-$  rzadko dochodzi do tworzenia zarodków z komórek kalusa (przeł. 4, 18–20). Stosowanie  $\text{NH}_4^+$  jako jedyne źródła azotu powoduje obniżenie pH środowiska do wartości hamujących embriogenezę. Te niekorzystne efekty można wyeliminować przez odpowiednie dobranie stężeń jonów  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NH}_4^+$  (30). Wykazano ponadto, że kalus hodowany początkowo na podłożach zawierających  $\text{NO}_3^-$ , a następnie pasażowany na pożywki wzbogacone o jony  $\text{NH}_4^+$ , nie odzyskuje zdolności embriogennych. Dane te sugerowały, że obecność zredukowanego azotu w pożywce jest niezbędna i musi się on w niej znajdować w momencie inicjowania embriogenezy (31). Jednakże prowadzone w ostatnich latach badania (32,33) wskazują, jak się wydaje, że udział zredukowanego azotu nie jest konieczny dla inicjacji somatycznej embriogenezy, ale obecność zarówno  $\text{NH}_4^+$  jak i  $\text{NO}_3^-$  stymuluje rozwój zarodków. Najwyższą intensywność embriogenezy uzyskiwano, kiedy stosunek  $\text{NH}_4^+$  do  $\text{NO}_3^-$  wynosił 2:1, a więc jak w pożywce Murashige i Skooga (34).

Pożywki podstawowe wzbogacone są zazwyczaj w takie składniki jak: kwas nikotynowy, tiamina, pirydoksyna, glicyna, mezoinozytol, hydrolizat kazeiny, a także mleczko kokosowe czy ekstrakty z drożdży. Zidentyfikowano też szereg białek i aminokwasów, które mogą wywierać stymulujący lub hamujący efekt na embriogenezę (35–39). Stwierdzono, że adenina wywiera korzystny wpływ na formowanie zarodków *in vitro* (18,13).

Istotną rolę w procesie somatycznej embriogenezy odgrywają także jony K, Na i Fe. Wyniki badań (40) dowodzą, że jony K są niezbędne dla indukcji embriogenezy, a ich brak w pożywce

powoduje zahamowanie tego procesu. Natomiast późniejsze dane wskazują, że chociaż wysokie stężenia  $K^+$  są konieczne dla inicjacji embriogenezy u marchwi (41), to u innych gatunków, np. *Solanum*, nie wywierają one wpływu na proces formowania zarodków (34). Jest więc prawdopodobne, że efekt jaki wywierają jony potasu zależy od ich endogennego poziomu w eksplantacie czy tkance kalusa.

Znaczenie jonów Na dla przebiegu procesu embriogenezy nie jest jednoznacznie określone. W literaturze spotkać można zarówno doniesienia wskazujące na brak ich oddziaływania lub nieznaczne tylko obniżanie embriogenezy (34), jak i na całkowite hamowanie tego procesu (13,19,4). Jest prawdopodobne, że efekt, jaki wywierają jony potasu zależy od ich koncentracji w pożywce. Rangan i Vasil (42) wykazali, że niskie stężenia  $Na^+$  nie wywierają wpływu na proces embriogenezy, natomiast stosunkowo wysokie koncentracje – hamują ten proces.

Brak jonów żelaza w pożywce hamuje rozwój zarodków w stadium globularnym (43). Podobne efekty obserwowano, gdy do pełnej pożywki dodano węgla aktywnego, który, jak wiadomo, adsorbuje jony żelaza (44).

## V. Zmiany genetyczne w kulturach *in vitro*

Roślinne kultury tkankowe mają tendencję do utraty zdolności różnicowania wraz z kolejnymi pasażowaniami. Przyczyny utraty potencjału embriogenego upatrywane są często w zmianach aparatu genetycznego.

Akumulacja aneuploidów i postępująca poliploidyzacja tkanek kalusa są często podawane jako przyczyna utraty potencjału morfogenetycznego. Jednakże, zdaniem Vasila (21), występowanie trwałych zmian genetycznych nie jest częstym zjawiskiem i niektóre z nich mogą być tymczasowe i odwracalne. Dlatego zapewne nie uzyskano dotąd rolniczo użytecznych gatunków roślin zbożowych czy traw, które byłyby wynikiem zmian genetycznych powstałych w trakcie hodowli *in vitro*.

Liczne przykłady w literaturze wskazują na istnienie genetycznej zmienności komórek w kulturach *in vitro*, a także u regenerowanych z nich roślin. Jednakże, jeszcze brakuje systematycznych i pogłębionych badań dotyczących zależności pomiędzy częstotliwością występowania i charakterem zmian genetycznych a rodzajem użytego do badań kalusa.

Komórki tworzące masę kalusa nie stanowią jednolitej pod względem genetycznym populacji – przynajmniej część z nich może ulec w trakcie hodowli *in vitro* daleko idącym modyfikacjom. Trzeba jednak podkreślić, że w takich heterogennych kulturach zdolność inicjowania embriogenezy posiadają wyłącznie komórki nie zmienione genetycznie. Wskazuje to na wielkie znaczenie jakie dla inicjacji i (lub) prawidłowego przebiegu somatycznej embriogenezy ma status genetyczny hodowanych *in vitro* komórek (21).

Badania somatycznych zarodków *Theobroma cacao* L. oraz produkowanych przez nie dwóch linii kalusa – embriogenego i nieembriogenego – wykazały różnice w liczbie chromosomów i zawartości DNA. W kalusie powstającym z somatycznych zarodków poziom ploidalności pozostawał typowy dla eksplantatów, co świadczy, że proces tworzenia kalusa nie jest związany z indukcją dodatkowych cykli endoreplikacyjnych. Jednakże, istniejące różnice w poziomie ploidalności między liniami embriogenego i nieembriogenego kalusa sugerują, że potencjał embriogeny może być związany z obecnością komórek poliploidalnych (Kononowicz, Floryanowicz – dane nie publikowane). Należy jednak zaznaczyć, że udział komórek o zwiększonej zawartości DNA w kalusie embriogenym i tworzących się z niego zarodkach jest bardzo niewielki, natomiast większość populacji stanowią komórki o zawartości DNA 2–4 C.

Zróżnicowanie genetyczne komórek spotyka się czasami w roślinach regenerowanych z kultur mieszanych (mixed), wykazujących zarówno zdolności embriogenne jak i organogenne (45).

## VI. Rola regulatorów wzrostu w indukowaniu zmian genetycznych

Istotny problem stanowi również udział egzogennych regulatorów wzrostu w indukowaniu zmian genetycznych.

Obserwowano bezpośrednią korelację pomiędzy poliploidalnością kultur tkankowych a obecnością 2,4-D w pożywce. Niektórzy autorzy uważają tę syntetyczną auksynę za główną przyczynę powstawania komórek poliploidalnych, inni zaś sugerują, że działa ona selektywnie na komórki o wyższym poziomie C DNA, stymulując je do podziałów (20).

Efekt, jaki wywierają regulatory wzrostu na poziom ploidalności oraz ilość komórek endopolipoidalnych w kulturze *in vitro*, zależy w znacznym stopniu od stężenia w jakim substancje te zostały użyte (20,46).

## VII. Możliwości praktycznego wykorzystania embriogenezy *in vitro*

Zainteresowanie totipotencją komórek roślinnych jest związane z możliwościami, jakie zjawisko to stwarza zarówno na polu badań podstawowych jak i użytkowych. Możliwość produkcji na dużą skalę roślin haploidalnych z mikrospor lub uzyskiwania tetraploidów z komórek endospermy znacznie zwiększają atrakcyjność, a w konsekwencji zainteresowanie metodami różnicowania *in vitro*. Ponadto, doskonalenie roślin ważnych z użytkowego punktu widzenia poprzez manipulacje na poziomie komórkowym (np. somatyczna hybrydyzacja), jest możliwe gdy somatyczne zarodki wykazują zdolność odtwarzania całej rośliny.

Uzyskiwanie roślin drogą somatycznej embriogenezy ma szczególnie istotne znaczenie, ponieważ zarodki wyprowadzane są z pojedynczych komórek. Można zatem oczekiwać uzyskania nowych linii, a w konsekwencji nowych odmian roślin. Pewne znaczenie użytkowe ma także fakt, że rozmnażanie roślin drogą somatycznej embriogenezy umożliwia otrzymanie roślin nie zakażonych wirusami. U niektórych gatunków, np. rośliny cytrusowe, somatyczna embriogeneza jest praktycznie jedyną drogą uzyskiwania zdrowych roślin.

Ostatnie lata przyniosły postęp w regeneracji roślin drogą somatycznej embriogenezy u zbóż i traw (21). Pozwala to na wykorzystanie opisanych metod w pracach nad doskonaleniem tych ważnych użytkowo roślin.

Produkcja zarodków somatycznych na skalę przemysłową wymaga synchronizacji ich powstawania. Rozpatrywana jest możliwość zastosowania technologii bioreaktorów do prowadzenia na dużą skalę somatycznej embriogenezy, oraz "opakowania" powstałych zarodków w sztuczne okrywy nasienne (47-50). Obiecujące wyniki w badaniach nad tworzeniem "kapsuł" okrywających powstałe *in vitro* zarodki, daje stosowanie takich substancji jak: hydrożele oraz substancje znane pod nazwą handlową: *sodium alginate*, *carrageenan* i *gerlite* (48). Sztuczne okrywy nasienne pozwalają na utrzymanie czy też dostarczenie takich istotnych dla rozwoju zarodka czynników jak *Rhizobium*, substancji odżywczych, czynników kontroli wzrostu i pestycydów. Sztuczne nasiona otrzymano już w przypadku takich roślin jak: seler, marchew, bawelna, sałata, kukurydza, lucerna i ziemniak.

Innym potencjalnym zastosowaniem somatycznej embriogenezy na skalę przemysłową może być produkcja ważnych użytkowo metabolitów. Opracowano np. metodę uzyskiwania masła kakaowego z somatycznych zarodków *Theobroma cacao* (51).

### Literatura

1. Raghavan V., (1976), *Experimental embryogenesis in vascular plants*. Academic Press, Inc. N.Y.
2. Tisserat B., Evans E. B., Murashige T., (1979), *Hort. Rev. IA IV red.* Janick J. Publishing Westport, Conn.
3. Vasil I. K., Vasil V., (1980), *International Review of Cytology, Suppl.* 11A, 145-173
4. Rangaswamy N. S., (1986), *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*, 96, 247-271.

5. Steward F. C., Ammirato P. V., Mapes M. O., (1970), *Ann. Bot.*, 34, 761-787.
6. McWilliams A. A., Smith S. M., Street H. E., (1974), *Ann. Bot.*, 38, 243-250.
7. Smith S. M., Street H. E., (1974), *Ann. Bot.*, 38, 223-241.
8. Konar R. N., Thomas E., Street H. E., (1972), *J. Cell Sci.*, 11, 77-93.
9. Thomas E., Konar R. N., Street H. E., (1972), *J. Cell Sci.*, 11, 95-109.
10. Kochba J., Spiegel-Roy P., (1977), *Hort. Science*, 12, 110-114.
11. Tisserat B., Murashige T., (1977), *In vitro*, 13, 785-789.
12. Sondhal M. R., Spahlinger D. A., Sharp W. R., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, 94, 101-108.
13. Sharp W. R., Sondhal M. P., Caldas L. S., Maraffa S. B., (1980), *Horticultural Reviews*, vol. 2A, IV, ed. Janick J., Westport. Conn.
14. Pence V. C., Hasegawa P. M., Janick J., (1979), *J. Am. Hort. Sci.*, 104, 145-148.
15. Kononowicz H., Kononowicz A. K., Janick J., (1984), *Z. Pflanzenphysiol.*, 113, 347-358; 359-366.
16. Kononowicz H., Janick J., (1988), *Acta Physiol. Plant.*, 10, 93-105; 107-114; 115-126.
17. Street H. E., Withers L. A., (1974), *Tissue Culture and Plant Science*, ed. Street H. E., 71-100, Academic Press, London.
18. Wetherell D. F., (1978), *Propagation of Higher Plants through Tissue Culture. A bridge between research and application. Proceedings of International Symposium Held at the University of Tennessee, Knoxville, 16-19*, ed. Karen J., Publ. Technical Information Center United States Dept. Energy.
19. Thorpe T. A., (1982), *Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry*, ed. Thomas D. T., Ellis B. E., Harney P. M., Kasha K. J., Peterson R. L., 115-139, *Plant Cell Culture University of Guelph, Guelph-Ontario-Canada*.
20. Bhojwani S. S., Razdan M. K., (1983), *Plant Tissue Culture. Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B. V., 159-180, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
21. Vasil I. K., (1987), *J. Plant. Physiol.*, 128, 193-218.
22. Terzi M., Sung Z. R., (1986), *Critical Review of Biotechnology*, 3, 303-330.
23. Jelaska S., (1974), *Physiol. Plant.*, 31, 257-261.
24. Lorz H., Potrykus I., Thomas E., (1977), *Abst. Conf. Regulation of Development in Plants*, 107, Halle, GDR.
25. Ammirato P. V., (1974), *Bot. Gaz.*, 135, 328-337, 65.
26. Kochba J., Spiegel-Roy P., Safran H., (1972), *Planta*, 106, 237-245.
27. Kochba J., Spiegel-Roy P., (1977), *Z. Pflanzenphysiol.*, 81, 283-288.
28. Kochba J., Spiegel-Roy P., (1977), *Environ. Exp. Bot.*, 17, 151-159.
29. Evans D. A., Sharp W. R., Flick E. C., (1981), *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*, ed. Thorpe T. A., 45-113, Academic Press, New York.
30. Dougal D. K., Verma D. C., (1978), *In Vitro*, 14, 180-182.
31. Kochlenbach W. H., (1978), *Frontiers of Plant Tissue Culture*, ed. Thorpe T. A., 59-66, University of Calgary Press., Calgary, Canada.
32. Kamada H., Harada H., (1982), *Plant Tissue Culture. Proc. V International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, ed. Fujiwara A., 115-116, The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo.
33. Kamada H., Harada H., (1984), *Plant Cell Physiol.*, 25, 27-38.
34. Gledlie S., Keller W., Setterfield G., (1983), *Can. J. Bot.*, 61, 656-666.
35. Wetherell D. F., Dougal D. K., (1976), *Physiol. Plant.*, 37, 97-103.
36. Kamada H., Harada H., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, 91, 453-463.
37. Stuart D., Strickland S. G., (1984), *Plant. Sci Lett.*, 34, 175-184.
38. Bradley P. M., El-Fiki F., Giles K. L., (1984), *Plant Sci. Lett.*, 34, 397-401.
39. Fieuberg A. A., Choi J. H., Ubich W. P., Sung Z. R., (1984), *Planta*, 162, 532-539.
40. Reinert J., Tazawa N., Semenoff S., (1976), *Nature (London)*, 216, 1215-1216.
41. Brown S., Wetherell D. F., Dougal D. K., (1976), *Physiol. Plant.*, 37, 73-79.
42. Rangan T. S., Vasil I. K., (1983), *Ann. Bot.*, 52, 59-64.
43. Havranek P., Vagera J., (1979), *Biol. Plant.*, 21, 412-417.
44. Heberle-Bors E., (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, 99, 339-347.
45. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J., (1983), *J. Exp. Bot.*, 34, 915-926.
46. Bayliss M. W., (1980), *International Review of Cytology. Suppl. 11A. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*, 113-144.

47. Ammirato P. V., (1983), Handbook of Plant Cell Culture, ed. Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y., 82–123, Mackmillan, New York.
48. Redenbaugh K., Viss P., Slade D., Fuji J. A., (1987), Plant Tissue and Cell Culture, ed. Green C. S., Somers D. A., Hackett W. P., Biesboer D. D., 473–493, New York, AR Liss.
49. Gupta P. K., Durzan D. J., (1987), Bio/Technology, 5, 147–151.
50. Kitto S. L., Janick J., (1985), J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110, 277–282.
51. Kononowicz A. K., Janick J., (1984), J. Amer. Soc. Hort. Sci., 109, 266–269.

### **Plant Embryogenesis *in vitro***

#### Summary

The ability of plant cells to regenerate complete organisms by somatic embryogenesis *in vitro* is one of the most important features of plants.

Somatic embryogenesis may be defined as the development of embryos from somatic cells, haploid cells or gametocytes and has been observed in about 200 Angiosperm and Gymnosperm species. Somatic embryogenesis *in vitro* has been described as occurring in two general ways: direct and indirect. The process of indirect embryogenesis can be divided into two phases: 1) induction of callus mass growth and 2) development of proembryogenic cells into the embryos.

The potential for somatic embryogenesis is not only genotype-specific but also strongly dependent on the developmental stage of explant and culture conditions. Embryogenic cells formation requires auxin of which 2,4-di-chloro acetic acid (2,4-D) is more commonly used, but the formation of somatic embryos occurs in auxin-free medium. Although a wide range of basal (media) has been used for induction of somatic embryogenesis, the best results were obtained with the Murashige and Skoog salts.

An understanding of somatic embryogenesis process increases our ability to utilize it as the technology for mass propagation, modification and improvement of plants.

#### *Adres dla korespondencji:*

Halina Kononowicz, Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16.