



## Kielkowanie i konwersja somatycznych zarodków *in vitro*

Ewa Kępczyńska

Zakład Biotechnologii Roślin, Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

### *In vitro* germination and conversion of somatic embryos

#### Summary

Somatic embryogenesis (SE), resembling zygotic embryogenesis, is a very efficient and fast method of vegetative plant propagation. Somatic embryos, the final products of this process, are immediately or after drying and/or encapsulation used as artificial seeds. SE efficiency is not only dependent on the quantity, but also on quality of somatic embryos. Although SE has been recorded for species across many genera and from a variety of plant tissues, regeneration of plants from somatic embryos is often a significant problem for some plant species. Many efforts have been made to obtain higher levels of germination and conversion of somatic embryos to plants.

This review will focus on the present knowledge about enhancing the vigor of somatic embryos with special attention paid to the effect of plant hormones (gibberellins, ethylene, abscisic acid), on germination and conversion of somatic embryos and their influence on the storage reserves content (starch, oligosaccharides), their hydrolytic products (raffinose, sucrose, glucose), and on the activity of hydrolytic enzymes ( $\alpha$ -amylase).

#### Key words:

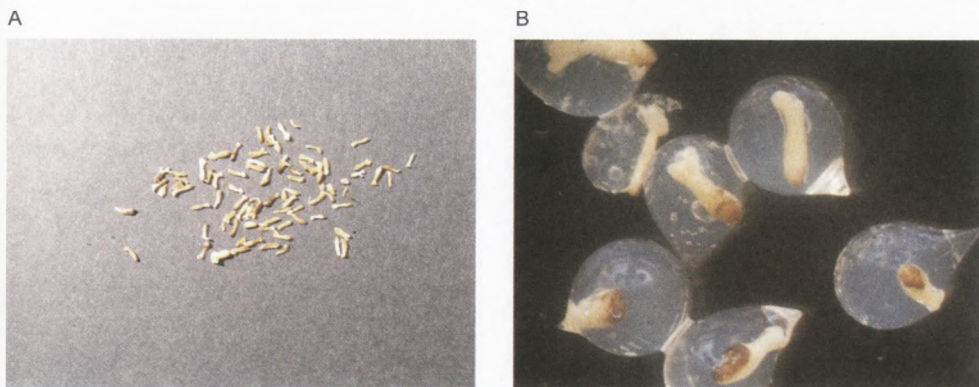
somatic embryogenesis, embryo germination, embryo conversion, storage reserves,  $\alpha$ -amylase activity, gibberellins, ethylene, abscisic acid.

#### Adres do korespondencji

Ewa Kępczyńska,  
Zakład Biotechnologii  
Roślin,  
Katedra Fizjologii  
i Biotechnologii Roślin,  
Uniwersytet Szczeciński,  
ul. Wąska 13,  
71-415 Szczecin.

### 1. Wstęp

Somatyczne zarodki powstają w procesie zwanym somatyczną embriogenezą (SE) przypominającą zygotyczną. Jest to bardzo szybki i wydajny sposób wegetatywnego rozmnażania roślin pozwalający na uniezależnienie produkcji cennego materiału siewnego od czynników klimatycznych lub umożliwiający przy-



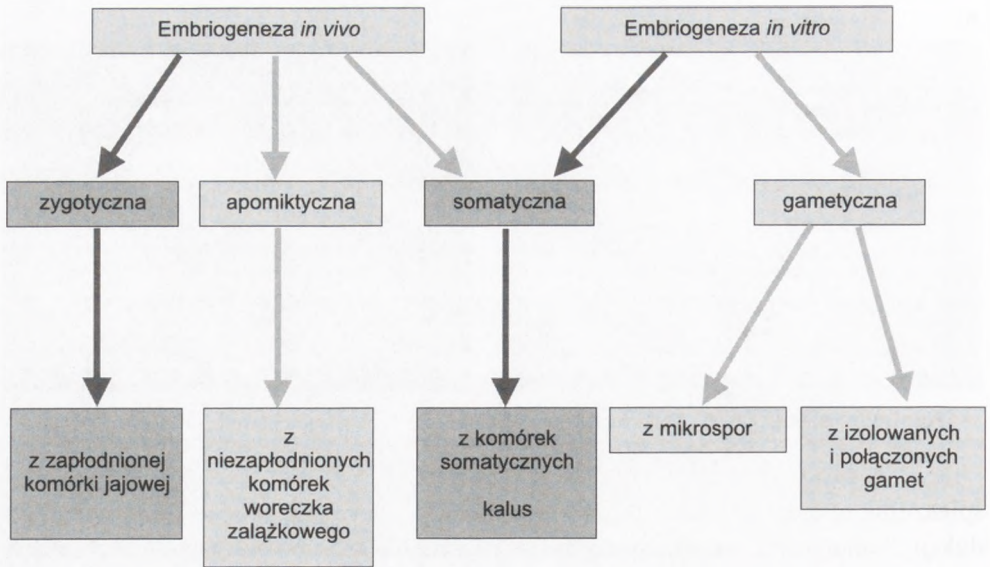
Fot. 1. Wysuszone (A) i otoczkowane (B) somatyczne zarodki *Medicago sativa* L. (fot. Jędrzejewski).

śpieszenie tworzenia nasion u roślin charakteryzujących się długim cyklem ich produkcji. Somatyczne zarodki mogą być bezpośrednio lub po wysuszeniu i/lub otoczkowaniu wykorzystane jako tzw. sztuczne nasiona (ang. *somseed*, *artificial seed*, *synthetic seed*) (fot. 1).

Pomimo postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach nad somatyczną embriogenezą, proces ten został poznany i stosowany dla setek gatunków roślin wyższych, nadal istnieje potrzeba optymalizacji warunków tego procesu. Metoda ta bowiem ma służyć do masowego wegetatywnego rozmnażania roślin, musi być zatem szybka i wydajna, tj. zdolna do wytworzenia kilku milionów roślin dziennie, a zatem ekonomicznie konkurencyjna w porównaniu z produkcją nasion zygocytynych w warunkach *in vivo*. Optymalizacja ta wymaga dokładnego poznania nie tylko procesów powstawania zarodków i ostatecznie ich kiełkowania i konwersji w normalnie wykształcone rośliny, ale także możliwości ich regulacji, a wiedza w tym zakresie jest nadal dosyć ograniczona.

## 2. Embriogeneza zygocytynna i somatyczna, podobieństwa i różnice

Wychodząc z założenia, że u roślin wyższych zarodek zygocytynny podczas swego naturalnego rozwoju w woreczku zalążkowym ma zapewnione optymalne warunki, to w celu optymalizacji warunków produkcji zarodków somatycznych w warunkach sztucznych *in vitro* powinny być uwzględnione nie tylko podobieństwa, ale głównie różnice w przebiegu obu tych procesów. U roślin wyższych mamy do czynienia z różnymi drogami prowadzącymi do embriogenezy, pierwszego i najważniejszego etapu w rozwoju rośliny (rys. 1). U większości gatunków roślin wyższych embriogeneza *in vivo* rozpoczyna się zapłodnieniem komórki jajowej przez plemnik i powstaniem diploidalnej zygoty. U okrytozalążkowych procesowi temu towarzyszy połączenie drugiego plemnika z komórką centralną i powstanie tkanki odżyw-



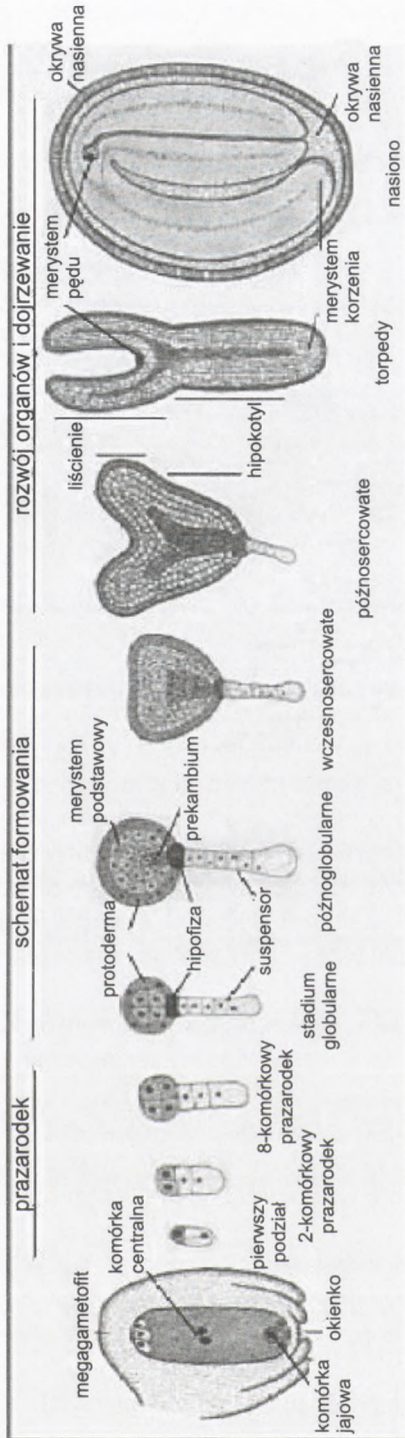
Rys. 1. Rodzaje embriogenezy u roślin wyższych.

czej – triploidalne bielmo (endosperma). Po zapłodnieniu zatem, zalążek jest aktywowany do inicjacji rozwoju zarodka, endospermy i okrywy nasiennej, czyli w rezultacie do powstania nasienia (rys. 2). Generalnie proces ten u tych roślin przebiega podobnie, chociaż poszczególne gatunki różnią się np. kierunkiem pierwszych podziałów zygoty, budową suspensora, budową i trwałością bielma. U roślin dwuliściennych wyróżnia się charakterystyczne stadia rozwojowe: wczesno-, środkowo- i późnoglobularne; wczesno- i późnosercowate; torpedy; liścieniowe – w kształcie laski i ostatecznie w kształcie litery U. W procesie somatycznej embriogenezy roślin dwuliściennych występują również podobne stadia takie jak wczesno-, środkowo- i późnoglobularne, wczesno- i późnosercowate, torpedy i liścieniowe (rys. 3) (1,2). Jednak w przebiegu obu tych procesów występują zasadnicze różnice:

1) zarodki zygotyczne *in vivo* rozwijają się w woreczku zalążkowym w wyniku fuzji gamet, natomiast somatyczne w naczyniach hodowlanych w warunkach *in vitro* bezpośrednio z komórek eksplantu pierwotnego posiadających kompetencję do embriogenezy (embriogeneza bezpośrednia) lub z komórek eksplantu, które muszą nabyć kompetencji do embriogenezy najczęściej przez odróżnicowanie jego tkanek, wytworzenie kalusa lub zawiesiny komórkowej otrzymanej z tego kalusa (embriogeneza pośrednia) (4,5);

2) zarodki zygotyczne podczas rozwoju w stadium wczesnoglobularnym rozwijają suspensor (wieszadefko), które zanika w stadium torpedy lub pozostaje w stadium szczątkowym, natomiast somatyczne nie mają suspensora, np. u lucerny, lipy drobnolistnej (6) lub w formie zredukowanej u rzepaku (24). Suspensor pełni rolę

**Rozwój zarodka okrytonasiennych**



Rys. 2. Schemat rozwoju zarodka okrytonasiennych.



Rys. 3. Porównanie embriogenezy zygotycznej i somatycznej u lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.).

transportera substancji pokarmowych do zarodka, łatwo pobiera substancje syntetyzowane w białmie. Dostarcza on także hormonów zarodkom w stadium globularnym i sercowatym. Jest miejscem syntezy stymulatorów wzrostu, cytokinin i auksyn, najważniejszych regulatorów wzrostu w procesie somatycznej embriogenezy, także giberelin oraz inhibitora wzrostu, kwasu abscysynowego (ABA), (7);

3) globularne stadia zarodków somatycznych są większe niż zygotycznych (3);

4) merystem wierzchołkowy zarodków somatycznych jest słabiej rozwinięty, np. winorośli i lipy (6);

5) zarodki zygotyczne roślin okrytozalążkowych wytwarzają jeden (jednoliścienne) lub dwa (dwuliścienne) liścienie, natomiast somatyczne wytwarzają ich dwa lub więcej i często niewielkie (3);

6) podczas rozwoju zarodka zygotycznego tworzy się zawsze bielmo, tkanka odżywcza dla rozwijającego zarodka. W dojrzałym nasieniu u niektórych gatunków bielmo może występować już w postaci zredukowanej (nasiona bezbielmowe, np. lucerna), a zatem w nasionach tych materiały zapasowe (skrobia i białka) znajdują się głównie w liścieniach, które wypełniają całe nasienie, a bielmo typu jądrowego, zawierające galaktomannany jako materiały zapasowe ulega redukcji w trakcie rozwoju zarodka. W rozwoju zarodka somatycznego nie ma procesu tworzenia się bielma (8);

7) zarodki somatyczne produkują takie same materiały zapasowe jak zygotyczne, ale w innym czasie, miejscu i w innych ilościach, np. w zarodkach zygotycznych

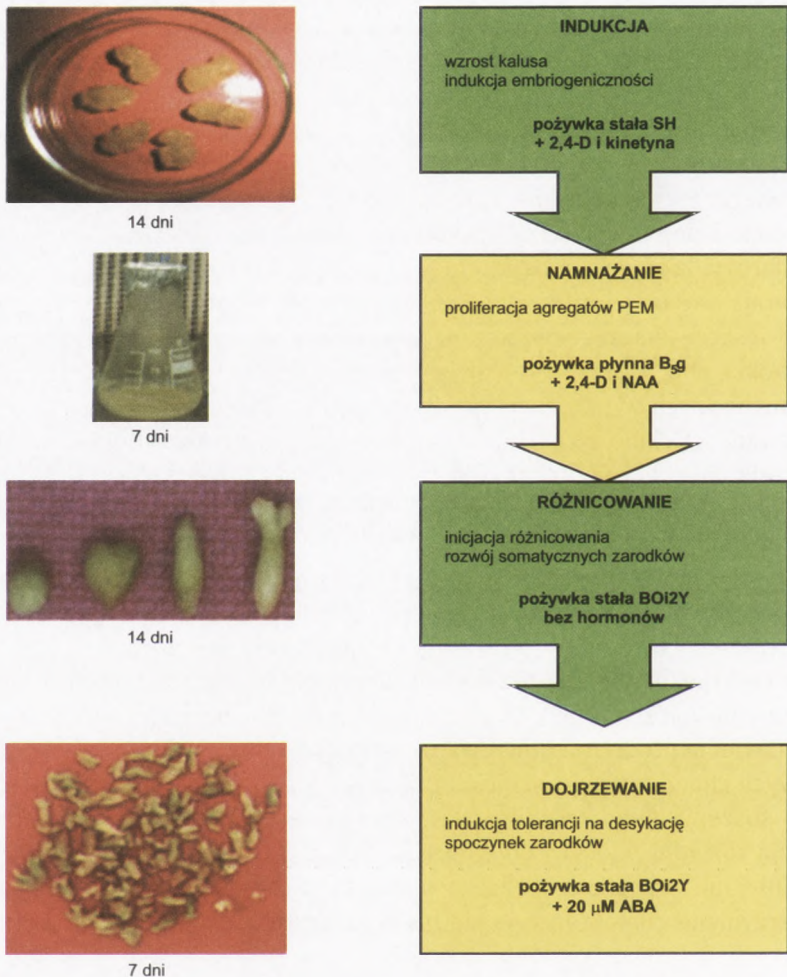
i somatycznych rzepaku syntetyzowane są te same białka zapasowe 12 S, ale w zarodkach zygotycznych w stadium liścieniowym, a w somatycznych w stadium globularnym i sercowatym i w mniejszych ilościach (9). W nasionach lucerny w stadium liścieniowym, głównie w liścieniach i wierzchołkach wzrostu, praktycznie w tym samym czasie gromadzone są 3 rodzaje białek zapasowych klasyfikowanych na podstawie ich rozpuszczalności na frakcje – 7S (alfina), 11S (medikagina) i 2S, natomiast w somatycznych te same białka i w tej samej kolejności, ale 11 S i 2 S powstają później i w mniejszych ilościach niż w zygotycznych i nie w liścieniach tylko w hipokotylu (10,11). Ponadto w somatycznych zarodkach lucerny głównym materiałem zapasowym jest skrobia, która powstaje na etapie przekształcania zarodków globularnych w torpedy. W dojrzałym zarodku somatycznym skrobia stanowi 6% jego suchej masy, a zatem 3 razy więcej niż w suchym zarodku zygotycznym (2%) (12). Także ilość kwasów tłuszczowych jest dużo większa w zarodkach somatycznych niż zygotycznych, odpowiednio 17-20% i 11% suchej masy zarodka. Obok skrobi węglowodanami zapasowymi w somatycznych i zygotycznych zarodkach lucerny są cukry rozpuszczalne di – (sacharoza) i oligosacharydy (rafinoza, stachioza), z tym, że w zarodkach somatycznych jest 9 razy więcej sacharozy niż w nasionach, co jest związane ze stosowaniem wysokich stężeń sacharozy w pożywcze podczas różnicowania i dojrzewania (3-5%). Pomimo jednak tak dużej zawartości w zarodkach sacharozy, która jest substratem w syntezie rafinozy, w porównaniu z nasionami, zawierają one mniej rafinozy i stachiozy. Zatem w zarodkach somatycznych nie wiadomo jeszcze dlaczego występują zaburzenia w biosyntezie oligosacharydów (13). Zarodki somatyczne lucerny nie zawierają w ogóle d-pinitolu lub ich galaktozylowych pochodnych w przeciwieństwie do nasion. Być może te wszystkie różnice spowodowane są słabo wykształconymi liścieniami i brakiem endospermy;

8) zarodki zygotyczne otoczone są zawsze okrywą nasienną, natomiast w rozwoju somatycznych zarodków nigdy ona nie powstaje, stąd nie ma stadium liścieniowego w postaci „laski” i odwróconej litery U (3);

9) rozwój zygotycznego zarodka kończy się generalnie powolnym odwodnieniem, które powoduje stopniową redukcję metabolizmu, czyli wraz z utratą wody z tkanek nasienia zarodek wchodzi w stan spoczynku. Jest to ważny etap, według Kermode (14) niezbędny, dla przejścia nasion z etapu dojrzewania do kiełkowania. Uwodnienie nasion typowych, tj. tolerujących odwodnienie (ang. *ortodox*) prowadzi do przestawienia programu dojrzewania na kiełkowanie. Przeciwnie zarodki nasion nietypowych charakteryzujących się dużą zawartością wody i nie znoszących intensywnego suszenia (ang. *recalcitrant*) są niezdolne do przetrwania desykcji i nie przerywają rozwoju podczas dojrzewania. Somatyczne zarodki są typu *recalcitrant* i naturalnie nie przechodzą okresu uśpienia, kiełkują przedwcześnie, a rośliny z nich otrzymane charakteryzują się niską zdolnością do przeżywania (15).

### 3. Przebieg somatycznej embriogenezy *in vitro*

Generalnie w somatycznej embriogenezie można wyróżnić główne 2 fazy, pierwszą, w której odróżnicowane komórki somatyczne nabierają kompetencji do embriogenezy oraz drugą, w której embriogeniczne komórki ujawniają swoją embriogeniczną kompetencję i różnicują się w somatyczne zarodki. Faza pierwsza nazywana „Fazą 0” przez Komamine i wsp. (16), fazą determinacji (ang. *determination phase*) przez Rao (17) lub fazą indukcji (ang. *induction phase*) przez Browna i wsp. (18) i wielu innych (2). Faza ta nie ma bezpośredniego odpowiednika w zygotycznej embriogenezie. Faza druga nazywana jest fazą różnicowania (2,18) i ma przebieg podobny do embriogenezy zygotycznej.



Rys. 4. Pośrednia somatyczna embriogeneza *in vitro* *Medicago sativa* L. –  2-etapowa oraz 4-etapowa.

Znanych jest wiele metod indukcji somatycznej embriogenezy różniących się liczbą i długością trwania wyróżnionych w jej przebiegu etapów oraz rodzajem stosowanych pożywek. Często wymienione 2 fazy, indukcja i różnicowanie, zachodzące na pożywkach stałych oddzielone są dodatkowym etapem, czyli namnażaniem zawiesiny embriogennej w pożywce płynnej, a po różnicowaniu stosuje się fazę dojrzewania, często dwustopniową (rys. 4). Efektywność procesu somatycznej embriogenezy uwarunkowana jest wieloma czynnikami endogennymi i egzogennymi, spośród których niewątpliwie regulatory wzrostu pełnią zasadniczą rolę (18,19). Do najważniejszych regulatorów uczestniczących w kontroli somatycznej embriogenezy należą znane stymulatory wzrostu auksyny i cytokininy oraz inhibitor wzrostu kwas abscysynowy. Rodzaj zastosowanego regulatora i stężenia ulegają zmianie w poszczególnych etapach somatycznej embriogenezy odzwierciedlając zróżnicowaną na nie wrażliwość, wynikającą m.in. z różnego poziomu endogennych fitohormonów (18,20,21).

#### **4. Kielkowanie i konwersja somatycznych zarodków (wigor)**

Somatyczna embriogeneza jest zatem procesem kompleksowym, kończącym się uzyskaniem funkcjonalnego zarodka. O przydatności somatycznej embriogenezy do masowej produkcji roślin decyduje zatem zarówno ilość, jak i jakość otrzymanych zarodków charakteryzowana często, tak jak dla nasion, terminem wigor. Wigor nasion to ich fizjologiczna właściwość, która przejawia się w zdolności do szybkiego i równomiernego kielkowania, wschodów i rozwoju zdrowych siewek w szerokim zakresie czynników środowiska, a zatem stanowi kryterium oceny ich jakości (AOSA, 22). Tylko dojrzałe zarodki o prawidłowej morfologii, które zakumulowały wystarczająco dużo substancji zapasowych i uzyskały tolerancję na desykcję pod koniec dojrzewania mogą kielkować i następnie ulegać konwersji do prawidłowo ukształtowanych siewek. Kielkowanie suchych somatycznych zarodków różni się od kielkowania nasion, ponieważ bardzo często nie dochodzi do wykształcenia pędów, zarodek często wytwarza tylko korzonek, ale nie liście. Rzadko ma miejsce odwrotna sytuacja, gdzie suchy zarodek somatyczny tworzy tylko pęd bez korzeni. Te obserwacje poczynione dla lucerny i innych gatunków roślin, np. dla rzepaku sugerują, że merystem wierzchołkowy pędu jest bardziej wrażliwy na stres desykacyjny niż merystem korzenia, stąd kielkowanie somatycznych zarodków określane jest jako zdolność do formowania korzonka zarodkowego, a konwersję jako równoczesny rozwój korzonka i pędu (23). Chociaż somatyczne zarodki mają zdolność do kielkowania i wytwarzania morfologicznie normalnej rośliny z korzeniem i pędem, to jednak ich rozwój jest wolniejszy. Siewki lucerny otrzymane z nasion osiągały dwukrotnie wyższą świeżą masę po 4 dniach niż roślinki otrzymane z somatycznych zarodków. Ponadto chociaż kielkowanie nasion i somatycznych zarodków było podobne (około 80%), to jednak pojawienie się korzonka i pierwszego liścia w nasionach było



odpowiednio 2,5 i 4 razy szybsze niż w zarodkach somatycznych (23). Dlatego generalnie uważa się, że somatyczne zarodki w porównaniu do nasion charakteryzuje niski wigor.

#### 4.1. Przyczyny niskiego wigoru somatycznych zarodków

Uważa się, że główną przyczyną słabego wigoru somatycznych zarodków jest brak odpowiedniej ilości materiałów zapasowych (24,25). Jednakże nawet, jeśli somatyczne zarodki zgromadzą stosunkowo wysoki poziom zapasów, ich wigor jest mniejszy niż nasion. Istnieje między innymi kilka możliwych przyczyn:

– Inne drogi syntezy materiałów zapasowych, m.in. skrobi. W nasionach np. *Medicago sativa* i *Cyamopsis tetragonoloba*, najważniejszy węglowodan zapasowy, galaktomannan, magazynowany jest w ścianach komórkowych endospermy, a produkty jej hydrolizy galaktoza i mannoza są absorbowane przez liścienie i tam jeśli nie są wykorzystywane w metabolizmie energetycznym, są przekształcane do sacharozy, a potem do skrobi, rezerwy tymczasowej, która jest mobilizowana, wtedy gdy spada zawartość sacharozy w wyniku jej transportu do wierzchołka (24,25). Inaczej jest w zarodkach somatycznych, nie ma w nich galaktomannanów, bo nie ma endospermy, a jedynym źródłem dla syntezy akumulowanej skrobi jest pożywka podczas dojrzewania zawierająca  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sacharozy. Różnica w zawartości materiałów zapasowych nasion i zarodków i dróg ich syntezy oraz akumulacji może determinować dostępność składników odżywczych dla rosnącej rośliny.

– Szybsza hydroliza materiałów zapasowych w zarodkach somatycznych. Podczas kiełkowania somatycznych zarodków ubytek materiałów zapasowych zachodzi znacznie szybciej niż w nasionach (24). Wynika to prawdopodobnie z braku w zarodkach somatycznych bielma z substancjami zapasowymi. W zarodkach somatycznych lucerny ma miejsce szybka hydroliza skrobi, już po 24 godz. imbibicji na pożywce regeneracyjnej zawartość jej zmniejszona była o połowę (24), a nawet jak wykazano w ostatnich badaniach Kępczyńskiej i Zielińskiej (27) o 80%, a po 48 godz. praktycznie jej zawartość jest bliska zeru. Ten szybki ubytek skrobi (w suchych zarodkach było jej 29 razy więcej niż po 24 h imbibicji) był skorelowany z szybkim wzrostem aktywności  $\alpha$ -amylazy, odpowiedzialnej za hydrolizę skrobi (27). Po 48 godz., kiedy w zarodkach zaczął pojawiać się korzonek zarodkowy poniżej 2 mm aktywność enzymu wyraźnie spadła. Podobny spadek w aktywności tego enzymu obserwowano podczas kiełkowania nasion lucerny (28). Podobnie szybko jak skrobia hydrolizowane były białka zapasowe, w ciągu 2 dni (24), a zatem sugeruje to, że zarodki somatyczne produkują enzymy hydrolityczne konieczne do mobilizacji tych zapasów. Chociaż w zarodkach somatycznych stwierdzono więcej skrobi i sacharozy niż w nasionach przed imbibicją, to jednak zawartość białek zapasowych (stanowią jedynie 10% w porównaniu z poziomem w zarodkach zygotycznych) jak i ich produktów hydrolizy była kilkakrotnie niższa w zarodkach somatycznych niż w zy-

gotycznych i stąd prawdopodobnie wolniejszy jest wzrost korzenia i hipokotyła oraz rozwoju liści (24,12). Aby zatem zwiększyć zawartość materiałów zapasowych w zarodkach stosuje się do pożywek sacharozę niezbędną do syntezy skrobi i oligosacharydów. Najlepszej jakości zarodki u wielu gatunków roślin otrzymano na pożywkach zawierających sacharozę w stężeniu 3-5%. Czasami lepszej jakości zarodki otrzymywano gdy sacharozę zastąpiono maltozą, np. zarodki kasztana jadalnego (29). W celu podwyższenia zawartości białek zapasowych, np. w zarodkach lucerny, soi stosuje się do pożywek aminokwasy, argininę, asparaginę i glutaminę oraz siarczany (23,24). Dotąd nie są znane przyczyny, dlaczego somatyczne zarodki nie utylizują swoich materiałów zapasowych jak nasiona. Być może związane to jest z nieobecnością u zarodków somatycznych okrywy nasiennej, która w nasionach reguluje pobieranie wody i wymianę gazową i prawdopodobnie to przyczynia się do słabej kontroli metabolizmu i tym samym słabego wigoru siewek (24).

– Uszkodzenie somatycznego zarodka podczas desykcji. Wiadomo, że żywotność somatycznych zarodków może być utracona podczas suszenia. Stosuje się różne metody desykcji, szybkie 2-godzinne w przepływie powietrza pod komorą laminarną lub kilkudniowe poprzez stopniowe przenoszenie do eksykatorów o coraz niższej określonej wilgotności (23). Nieodpowiednie suszenie w nieodpowiednim stadium może spowodować uszkodzenie zarodków, dlatego niezbędne jest zaindukowanie odporności na desykcję. Niedostateczna indukcja tolerancji na desykcję może być przyczyną obniżenia wigoru somatycznych zarodków (31,32).

– Szybsze pęcznienie zarodków somatycznych z powodu braku okrywy nasiennej, co może być przyczyną ich uszkodzenia i słabego wigoru, np. zarodków marchwi (33). Wiadomo, że szybkie pobieranie wody przez nasiona, czyli szybkie pęcznienie ma niekorzystny wpływ na ich kielkowanie (26). Dlatego ważne jest utrzymanie początkowego stopnia pobierania wody na niskim poziomie.

– Anormalny rozwój stożka wzrostu pędu w zarodkach somatycznych, który obserwowano u marchwi (34).

– Słaby rozwój liścieni w somatycznych zarodkach, a zatem materiały zapasowe gromadzą się głównie w hipokotyli, a nie w liścieniach. W nasionach są dwa główne centra metaboliczne: organy magazynujące (endosperma i liścienie), gdzie rezerwy są hydrolizowane, oraz wydłużający się wierzchołek zarodka, do którego docierają produkty hydrolizy i tam są wykorzystywane do różnych syntez związanych z powiększaniem się komórek. W konsekwencji imbibicja wysuszonych zarodków somatycznych uruchamia aktywność metaboliczną i zapoczątkowuje wydłużanie tych samych komórek, w których jednocześnie ma miejsce hydroliza materiałów zapasowych komórek. Usytuowanie procesów anabolicznych i katabolicznych w tym samym miejscu może powodować brak kontroli metabolizmu i w konsekwencji obniżyć wigor (24).

## 4.2. Hormonalna regulacja kiełkowania i konwersji

Spośród wielu endogennych i egzogennych czynników wpływających na somatyczną embriogenezę w kulturach *in vitro* takich jak genotyp rośliny, stan fizjologiczny rośliny, jakość i natężenie światła, rodzaj i stężenie makro- i mikroelementów, niewątpliwie regulatory wzrostu (auksyny, cytokiny, kwas absycynowy) decydują o uzyskaniu embriogeniczności oraz przebiegu i wydajności embriogenezy. Danych dotyczących udziału hormonów w regulacji kiełkowania i konwersji jest zdecydowanie mniej.

Znanych jest wiele danych dotyczących zastosowania fitohormonów do poprawy wigoru wielu nasion. Najczęściej stosowane są gibereliny. Istnieją również informacje dotyczące poprawy wigoru somatycznych zarodków przez te hormony. Gibereliny to bardzo liczna grupa regulatorów wzrostu i kiełkowania nasion syntetyzowanych przez wierzchołkowe części korzeni, najmłodsze liście pędów, pręciki, rozwijające się nasiona. W nasieniu bogatym źródłem giberelin są – tarczka, liścienie, endosperma oraz oś zarodka. Wiadomo również, że duże ilości giberelin, obok auksyn, cytokinin i ABA, gromadzi się w suspensorze rozwijającego się zarodka zygocytowego i dlatego uważa się, że pełnią one główną rolę w embriogenezie zygocytowej (7). Stwierdzono także, że suspensor nie tylko jest przekaźnikiem giberelin do rozwijającego się zarodka *Phaseolus*, ale również w komórkach suspensora są one syntetyzowane (35,36). Podobne związki znaleziono w suspensorach *Tropaeolum maius* (37) i *Cytisus laburnum* (38). Największe zapotrzebowanie na endogenną giberelinę podczas wzrostu elongacyjnego wierzchołka wzrostu zarodka zygocytowego przypada pomiędzy stadium globularnym a wczesnoliścieniowym (39). Mechanizm stymulacji przez giberelinę wzrostu elongacyjnego wierzchołka jest jeszcze słabo poznany (40).

GA<sub>3</sub> zaplikowany do pożywki regeneracyjnej stymulował kiełkowanie somatycznych zarodków *Aesculus hippocastanum*, *Citrus sinensis*, *Coryllus avellana* (41), *Medicago sativa* L. (27) oraz konwersję *Medicago falcata*, *M. sativa* (41,27), *Dioscorea alata* L. (43), *Corydalis yanhusuo* (44). Zapotrzebowanie somatycznych zarodków lucerny na giberelinę podczas kiełkowania i konwersji potwierdzono w badaniach Kępczyńskiej i Zielińskiej (27) z wykorzystaniem ancymidolu, inhibitora biosyntezy giberelin. Ancymidol zastosowany w stężeniu 0,1 i 1 μM powodował drastyczną redukcję procentu kiełkowania o 42 i 84,5%, oraz konwersji o 72 i 87% w porównaniu do kontroli. Zatem ten hamujący wpływ ancymidolu wskazuje, że te procesy wymagają endogennych giberelin. Obserwowany stymulujący, chociaż niewielki, wpływ gibereliny w stężeniu 1 μM na wspomniane procesy, może wskazywać, że poziom endogennych giberelin jest raczej wystarczający dla kiełkowania i konwersji tych zarodków.

Odmienną reakcję na obecność w pożywce ancymidolu wykazywały somatyczne zarodki szparaga jadalnego, inhibitor ten w stężeniach 1, 2 i 3 μM zwiększał wyrażnie procent konwersji (45), co świadczy o braku zapotrzebowania na giberelinę podczas tego procesu. Skoro brak jest w rozwoju somatycznych zarodków wielu roślin

suspensora, miejsca gromadzenia się i syntezy między innymi giberelin, podjęto próbę wyjaśnienia czy aplikacja GA<sub>3</sub> podczas namnażania się zawiesiny embriogenicnej lucerny, czyli we wczesnych stadiach tworzenia się somatycznych zarodków w stadium globularnym, będzie miała wpływ na kiełkowanie powstałych z komórek tej zawiesiny zarodków lucerny. Wcześniej ustalono, że egzogenna GA<sub>3</sub> hamuje wzrost kalusa, stymuluje indukcję i tworzenie zarodków lucerny na pożywkach stałych (46). Chociaż giberelina w stężeniu 1 μM obecna podczas kiełkowania stymulowała ten proces, to podana w tym samym stężeniu podczas proliferacji zawiesiny w 3 i 4 dniu powodowała nie tylko zahamowanie jej namnażania o 80% oraz całkowitą liczbę otrzymanych zarodków, ale również zahamowanie kiełkowania o ponad 60% i konwersji somatycznych o ponad 70% uzyskanych z tej zawiesiny zarodków (47). Hormon ten użyty w piątym dniu namnażania zawiesiny nie miał wpływu na ilość otrzymanej zawiesiny i liczbę zarodków, natomiast także hamował kiełkowanie i konwersję. Zastosowanie gibereliny w 100 razy niższym stężeniu w trzecim dniu namnażania zawiesiny embriogenicnej zwiększyło produkcję zarodków somatycznych w stadium globularnym, chociaż nie zwiększyło to ostatecznie procentu skiełkowanych i konwertujących zarodków lucerny. Na podstawie tych wyników wyraźnie wskazuje się na różną wrażliwość tkanek na egzogenną giberelinę. Zastosowana w tym samym dniu namnażania w najwyższym stężeniu (1 μM) hamowała badane procesy, natomiast w sto razy niższym (0,01 μM) stymulowała tworzenie zarodków w stadium globularnym i nie hamowała regeneracji somatycznych zarodków. Zastosowanie ancymidolu (0,1 i 1 mM) podczas proliferacji zawiesiny embriogenicnej spowodowało hamowanie wytwarzania zawiesiny komórkowej, zarodków, ich rozwoju, a także kiełkowanie i konwersję. Na podstawie tych wyników sugeruje się, że gibereliny syntetyzowane we wczesnych stadiach rozwoju (3, 5, 7 dzień proliferacji zawiesiny) wymagane są zarówno do produkcji jak i do kiełkowania i konwersji somatycznych zarodków lucerny. Zapotrzebowanie na giberelinę podczas wydłużania osi zarodków oraz rozwoju liścieni stwierdzono podczas embriogenezy somatycznej z mikrospor *Brassica napus* (40). Po zastosowaniu unikonazolu, inhibitora biosyntezy giberelin, do 10-dniowych kultur zarodków globularnych obserwowano hamowanie rozwoju liścieni i wydłużania osi zarodka.

Na podstawie tych wyników przypuszcza się, że gibereliny są niezbędne w procesie somatycznej embriogenezy lucerny. Podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu ich działania, gdyż brak jest danych na ten temat (27). W nasionach mechanizm działania tych hormonów najlepiej poznany został podczas kiełkowania nasion zbóż i polega na indukcji przez gibereliny syntezy i aktywacji α-amylazy odpowiedzialnej za hydrolizę magazynowanej skrobi do rozpuszczalnych cukrów szybko wykorzystywanych w procesach rozwoju zarodka (25). W 2004 r. Godbole i wsp. (48) wykazali podwyższenie aktywności α-amylazy podczas wczesnego kiełkowania zarodków somatycznych rośliny jednoliściennej, bambusa. Kępczyńska i Zielińska (27) wykazały po raz pierwszy, że u roślin dwuliściennych egzogenna giberelina obecna w pożywce regeneracyjnej drastycznie przyspieszała utylizację skrobi w zarodkach soma-

tycznych lucerny. Przeciwnie, ancymidol obecny w pożywce spowalniał proces zniknięcia skrobi. Przyspieszenie utylizacji skrobi przez giberelinę i spowolnienie tego procesu przez jej inhibitor syntezy, ancymidol, było skorelowane odpowiednio ze wzrostem lub spadkiem aktywności  $\alpha$ -amylazy pod ich wpływem. Stymulujący zatem wpływ gibereliny na kiełkowanie i konwersję somatycznych zarodków lucerny realizowany jest poprzez przyspieszenie rozkładu materiału zapasowego jakim jest skrobia w wyniku aktywacji  $\alpha$ -amylazy. W uzyskanych wynikach wskazuje się również, że zawartość skrobi może być markerem wigoru somatycznych zarodków lucerny.

Ponadto stwierdzono, że zahamowanie biosyntezy giberelin podczas namnażania zawiesziny embriogennej lucerny powoduje zaburzenia akumulacji di- i oligosacharydów w zarodkach (brak sacharozy i rafinozy, obecna tylko stachioza), co w konsekwencji obniżyło ich regenerację (47). Prawdopodobnie zaburzenia w syntezie gibereliny mogą powodować zatem zakłócenia w akumulacji węglowodanów jako materiałów zapasowych.

Innym hormonem, który należałoby brać pod uwagę w kontekście wigoru nasion jest etylen, znany stymulator kiełkowania nasion wielu gatunków roślin, procesów dojrzewania i starzenia roślin (49,50). Jest on zarazem inhibitorem wzrostu roślin. Produkują go wszystkie organy roślin wyższych – liście, łodygi, korzenie, bulwy, kwiaty, owoce, nasiona, siewki oraz bakterie i grzyby (50-52). Wiadomo, że hormon ten wydzielany jest przez kultury komórek, tkanek i organów w warunkach *in vitro* i ulega kumulacji w zamkniętych naczyniach hodowlanych (53,54). Etylen produkowany jest z różną intensywnością we wszystkich etapach somatycznej embriogenezy i zależy od gatunku rośliny, typu komórek, tkanek i organów, ich stadium fizjologicznego oraz stężenia dodanych auksyn i / lub cytokinin, a także ABA w kulturach *in vitro*. Czynnikiem limitującym produkcję etylenu we wszystkich etapach somatycznej embriogenezy lucerny jest głównie zawartość kwasu 1-aminocyklopropa-1-karboksyowego, ACC, prekursora biosyntezy etylenu oraz aktywność oksydazy ACC, enzymu katalizującego przekształcanie ACC do etylenu (55-57). Niewiele jest danych dotyczących udziału etylenu w regeneracji somatycznych zarodków. Kong i Yeung (58) obserwowali, że etylen może powodować wytworzenie dużych przestworów międzykomórkowych w wierzchołkach wzrostu pędu somatycznych zarodków *Picea glauca*, co obniża zdolność do konwersji. Zablockowanie produkcji etylenu przez azotan srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) w somatycznych zarodkach pszenicy zapobiegło ich przedwczesnemu kiełkowaniu (59). Zahamowanie syntezy etylenu w zarodkach lucerny przez jego inhibitory aminoetoksywinyloglicynę (AVG) i kwas salicylowy podczas kiełkowania i konwersji spowodowało silne ograniczenie tych procesów (47). Inhibicja tych procesów związana była z zahamowaniem aktywności  $\alpha$ -amylazy przez te inhibitory, co w konsekwencji doprowadziło do zablockowania hydrolizy skrobi podczas regeneracji somatycznych zarodków lucerny. Nie tylko zatem giberelina, ale i etylen wpływa na aktywność tego enzymu. Zastosowanie inhibitora działania etylenu 1-metylocyklopropenu (1-MPC) we wcześniejszym etapie

somatycznej embriogenezy, tj. podczas namnażania zawiesiny embriogennej silnie zahamowało ten proces, co w konsekwencji drastycznie ograniczyło całkowitą liczbę otrzymanych z niej zarodków oraz zahamowało ich rozwój. Otrzymano niewiele zarodków w stadium liścieniowym, co uniemożliwiło sprawdzenie ich regeneracji. Zastosowanie tego inhibitora podczas różnicowania, również ograniczyło produkcję zarodków i ich rozwój, a także spowodowało 60% inhibicję kiełkowania i konwersji zarodków liścieniowych (47). Są to jedyne dane udziału etylenu w kiełkowaniu i konwersji somatycznych zarodków.

Hormonem, który ma istotny wpływ na rozwój zarodków zarówno zygotycznych jak i somatycznych jest powszechnie występujący u roślin inhibitor wzrostu i kiełkowania nasion, zwany też markerem stresu abiotycznego i biotycznego, kwas abscysynowy (ABA). Podczas rozwoju zarodka zygotycznego i somatycznego odpowiedzialny jest za syntezę białek zapasowych, białek z grupy LEA (ang. *late embryogenesis abundant*), indukując nabywanie tolerancji na desykcję i spoczynek czyli zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu (25). Podczas somatycznej embriogenezy u wielu gatunków roślin, w czasie dojrzewania, jego obecność jest niezbędna, zwykle w stężeniach 10-50  $\mu\text{M}$ . Szczególnie ważne jest to dla roślin iglastych, chociaż jeszcze nie wiadomo dlaczego. Jednakże niski wigor somatycznych zarodków może być wynikiem pozostałości ABA wcześniej zaaplikowanego podczas dojrzewania (31). Jego synteza podczas somatycznej embriogenezy lucerny jest zróżnicowana. Stwierdzono, że w ogonkach liściowych lucerny jego poziom jest wysoki, a następnie podczas wzrostu kalusa i zawiesiny embriogennej znacznie się obniża, prawie do zera, po czym następuje wzrost proporcjonalny do stadium rozwoju zarodka, od globularnego do wczesnoliścieniowego (57). W stadium późnoliścieniowym zawartość ABA znowu się znacznie obniża i osiąga poziom zbliżony do zawartości w zarodkach w stadium globularnym. Wyłożenie zarodków późnoliścieniowych na pożywkę dojrzewającą wzbogaconą 20  $\mu\text{M}$  powodowało maksymalny wzrost poziomu ABA, co w konsekwencji zapobiegło ich przedwczesnemu kiełkowaniu i zaindukowało tolerancję na desykcję. Istnieje jednakże możliwość, że to znaczne podwyższenie zawartości ABA podczas dojrzewania może mieć ujemne konsekwencje dla kiełkowania i konwersji. Ruduś i wsp. (21) wykazali, że ABA jest inhibitorem regeneracji somatycznych zarodków lucerny. Potwierdzeniem tej sugestii są wyniki otrzymane z zastosowaniem do pożywki regenerującej, fluridonu, inhibitora biosyntezy ABA (47). Zablockowanie biosyntezy ABA w zarodkach podczas kiełkowania i nieznaczna, ale istotna poprawa ich kiełkowania na pożywce zawierającej 1  $\mu\text{M}$  fluridonu, wskazuje, że zarodki zawierają zbyt wysoką pozostałość ABA po dojrzewaniu w obecności tego inhibitora (20  $\mu\text{M}$ ). Wydaje się, że poziom ABA w uzyskanych zarodkach somatycznych może być czynnikiem limitującym ich wigor. Podczas suszenia somatycznych zarodków zmniejsza się w nich jego zawartość (60), ale metody suszenia są różne, stąd aktualnie nie wiadomo jak zmienia się zawartość ABA podczas tych zabiegów. Ponadto można przypuszczać, że jakikolwiek stres podczas procesu SE może zwiększyć w tkankach zawartość ABA lub innych tzw. stresowych hormonów,

np. jasmonianów. Stwierdzono czterokrotne zwiększenie zawartości ABA i kwasu jasmonowego, a dziesięciokrotne prekursora biosyntezy związków jasmonowych kwasu oksofitodienowego (OPDA) w ogonkach liściowych poddanych sterylizacji (75% etanol, 3,5% podchloryn sodu, trzykrotne płukanie sterylną wodą) w porównaniu do zawartości w ogonkach nie sterylizowanych (57). Nie zaobserwowano natomiast zmian w zawartości auksyny (IAA), podstawowego stymulatora wzrostu dla procesu somatycznej embriogenezy, a zatem pula endogennych inhibitorów wzrostu w początkowej fazie somatycznej embriogenezy zostaje podwyższona z powodu stresu. Inne abiotyczne czynniki stresowe podczas uprawy roślin matecznych, np. niska wilgotność, prawdopodobnie mogą zwiększać zawartość wspomnianych inhibitorów wzrostu. Stwierdzono, że somatyczne zarodki lucerny uzyskane z eksplantów pobranych z roślin matecznych rosnących w fitotronie o zredukowanej wilgotności względnej (40%) w stosunku do optymalnej (80%) kiełkowały gorzej aż o 30% (61). Wyniki te stanowią potwierdzenie wcześniejszych informacji Bewley'a i Blacka (25), że warunki stresowe panujące podczas uprawy roślin matecznych mogą drastycznie obniżyć ilość i jakość somatycznych zarodków lucerny.

## 5. Podsumowanie

Somatyczna embriogeneza jest wielostopniowym procesem regeneracyjnym rozpoczynającym się od otrzymania proembriogenicznej masy komórek (ang. PEMs), a następnie obejmującym różnicowanie somatycznych zarodków, dojrzewanie, desykcję i regenerację roślin (kiełkowanie i konwersja). Do skutecznego zrealizowania tego procesu wiele manipulacji czynnikami fizycznymi i chemicznymi musi mieć miejsce we właściwym czasie. Chociaż został dokonany wielki postęp w poznaniu mechanizmów kontrolujących somatyczną embriogenezę, głównie jej indukcję oraz różnicowanie zarodków to nadal istnieje potrzeba uzupełnienia wiedzy dotyczącej kontroli procesu dojrzewania, z udziałem ABA, oraz kiełkowania i konwersji somatycznych zarodków. Należy też dokładnie ustalić dla poszczególnych gatunków roślin, kiedy i jakie czynniki powodują słaby rozwój liścieni, głównych organów odpowiedzialnych za odżywianie zarodków somatycznych i w rezultacie za ich wigor.

## Literatura

1. de Jong A. J., Schmidt E. D. L., de Vries S. C., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 367-377.
2. Dodeman V. L., Ducreux G., Kreis M., (1997), *J. Exp. Bot.*, 48, 1493-1509.
3. Xu N., Bewley J. D., (1992), *Plant Cell Rep.*, 1, 279-284.
4. Williams E. G., Maheswaran G., (1986), *Ann. Bot.*, 7, 443-462.
5. Ammirato P. V., (1987), *Organizational events during somatic embryogenesis*, in: *Plant Tissue and Cell Culture*, Eds. Green C. E., Somers D. A., Hackett W. P., Biesboer D. D., 57-81, New York, Alan R. Liss.
6. Karkonen A., (2000), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 61, 205-214.
7. Yeung E. C., Meinke D. W., (1993), *The Plant Cell*, 5, 1371-1381.

8. Lai F. M., McKersie B. D., (1994), *Plant Sci.*, 100, 211-219.
9. Shoemaker R. C., Christofferson S. E., Galbraith D. W., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 12-15.
10. Krochko J. E., Pramanik S. K., Bewley J. D., (1992), *Plant Physiol.*, 99, 46-53.
11. Hrochko J. E., Bantroch D. J., Greenwood J. S., Bewley J. D., (1994), *J. Exp. Bot.*, 45, 699-708.
12. Sreedhar L., Bewley J. D., (1998), *Plant Sci.*, 134, 31-44.
13. Horbowicz M., Obendorf R. L., McKersie B. D., Viands D. R., (1995), *Plant Sci.*, 109, 191-198.
14. Kermod A. R., (1990), *Critic. Rev. Plant Sci.*, 9, 155-195.
15. Hoekstra F. A., Golovina E. A., Tetteroo F. A. A., Wolkers W. F., (2001), *Cryobiol.*, 43, 140-150.
16. Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Taya T., Fujiwara A., Tsukuhara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K., Fujimura T., (1992), *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 28P, 11-14.
17. Rao K. S., (1996), *J. Biosci.*, 21, 827-841.
18. Brown D. C. W., Finstad K. I., Watson E. M., (1995), *In vitro Embryogenesis in Plants*, Ed. Thorpe T. A., 345-415, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
19. McKersie B. D., van Acker S., Lai F. M., (1995), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds*, Ed. Bajaj Y. P. S., 153-169, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
20. Bell L. M., Trigiano R. N., Conger B. V., (1993), *Envir. Exp. Bot.*, 33, 495-499.
21. Rudaś I., Kępczyńska E., Kępczyński J., (2006), *Plant Growth Regul.*, 48, 1-11.
22. Association of Official Seed Analysts (AOSA), (1983), *Seed vigor testing handbook*, No. 32.
23. McKersie B. D., Brown D. C. W., (1996), *Seed Science Research*, 6, 109-126.
24. Lai F.-M., Lecouteux C. G., McKersie B. D., (1995), *J. Plant Physiol.*, 145, 507-513.
25. Schmidt M. A., Tucker D. M., Cahoon E. B., Parrott W. A., (2005), *Plant Cell Rep.*, 24, 383-391.
26. Bewley J., Black M., (1994), *Seeds: physiology of development and germination*, Plenum Press, New York, London.
27. Kępczyńska E., Zielińska S., (2006), *Plant Growth Regul.*, (in press).
28. Kohno A., Nanmori T., (1991), *Plant Cell Physiol.*, 32, 459-466.
29. Corredoira E., Ballester A., Vieitez A. M., (2003), *Ann. Bot. (Lond)*, 92, 129-136.
30. Lai F.-M., McKersie B. D., (1995), *J. Plant Physiol.*, 146, 731-735.
31. Anandarajah K., McKersie B. D., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 451-455.
32. Lecouteux C. G., Lai F.-M., McKersie B. D., (1993), *Plant Sci.*, 94, 207-213.
33. Tetteroo F. A. A., de Bruijn A. Y., Henselmans R. N. M., Wolkers W. F., van Aelst A. C., Hoekstra F. A., (1996), *Plant Physiol.*, 111, 403-412.
34. Nickle T. C., Yeung E. C., (1993), *Am. J. Bot.*, 80, 1284-1291.
35. Ceccarelli N., Lorenzi R., Alpi A., (1981), *Z. Pflanzenphysiol.*, 102, 37-44.
36. Piaggese A., Picciarelli P., Lorenzi R., Alpi A., (1989), *Plant Physiol.*, 91, 362-366.
37. Picciarelli P., Alpi A., Pistelli L., Scalet M., (1984), *Planta*, 162, 566-568.
38. Picciarelli P., Piaggese A., Alpi A., (1991), *Phytochem.*, 30, 1789-1792.
39. Yeung E. C., Sussex I. M., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, 91, 423-433.
40. Hays D. B., Yeung E. C., Pharis R. P., (2002), *J. Exp. Bot.*, 53, 1747-1751.
41. Litz R. E., Gray D. J., (1992), *Organogenesis and somatic embryogenesis*, in: *Biotechnology of perennial fruit crops*, Eds. Hammerschlag F. A., Litz R. E., CAB International, Wallingford.
42. Ivanova A., Velcheva M., Denchev P., Atanassov A., Onckelen van H. A., (1994), *Physiol. Plant.*, 92, 85-89.
43. Twyford C. T., Mantell S. H., (1996), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 17-26.
44. Kuo C.-L., Sagare A. P., Lo S.-F., Lee C.-Y., Chen C.-C., Tsay H.-S., (2002), *J. Plant Physiol.*, 159, 46-53.
45. Li B., Wolyn D. J., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 529-533.
46. Rudaś I., Kępczyńska E., Kępczyński J., (2002), *Plant Growth Regul.*, 36, 91-95.
47. Zielińska S., (2006), praca doktorska, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin, 1-182.
48. Godbole S., Sharma M., Nagar E. P. K., Ahuja P. S., (2004), *J. Plant Physiol.*, 161, 245-248.
49. Sisler E. C., Yang S. F., (1984), *Biosci.*, 34, 234-238.
50. Kępczyński J., Kępczyńska E., (1997), *Physiol. Plant.*, 101, 720-726.
51. Kępczyńska E., Zielińska S., Kępczyński J., (2003), *Plant Growth Regul.*, 39, 13-17.
52. Kępczyńska E., (2005), *Acta Physiol. Plant.*, 27, 4A, 491-496.



53. Biddington N. L., (1992), *Plant Growth Regul.*, 11, 173-187.
54. Florek I., Kępczyński J., (1995), *Materiały Sympozjalne Ogólnopolskiej Konferencji Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*, red. Dubert F., Skoczkowski M., ZFR PAN, Kraków, 37-44.
55. Meyer E. G. M., (1989), *J. Exp. Bot.*, 40, 479-484.
56. Kępczyński J., McKersie B. D., Brown D. C. W., (1992), *J. Exp. Bot.*, 43, 1199-1202.
57. Ruduś I., (2004), praca doktorska, Uniwersytet Szczeciński, 1-227.
58. Kong L. S., Yeung E. C., (1994), *Plant Sci.*, 104, 71-80.
59. Fernandez S., Michaux-Ferrière N., Coumans M., (1999), *Plant Growth Regul.*, 28, 147-155.
60. Kermode A. R., Dumbroff E. B., Bewley J. D., (1989), *J. Exp. Bot.*, 40, 303-313.
61. Zielińska S., Kępczyńska E., (2006), *Materiały Sympozjalne III Ogólnopolskiego Sympozjum Człowiek i środowisko przyrodnicze Pomorza Zachodniego*, (w druku).