



## Regulatory wzrostu w somatycznej embriogenezie *Medicago sativa* L.

Jan Kępczyński<sup>1</sup>, Ewa Kępczyńska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

<sup>2</sup>Zakład Biotechnologii, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

### Plant growth regulators and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L.

#### Summary

Somatic embryogenesis, resembling zygotic embryogenesis *in vivo*, is considered to be an efficient method of *in vitro* propagation of a number of agronomically important plant species including *Medicago sativa* L. and it offers an *in vitro* experimental system for studying the embryo development. Artificial seed technology is one of the important applications of the process. Induction of embryogenesis, embryo development and induction desiccation tolerance are affected by plant growth regulators.

The review will focus on the effect of plant growth regulators: auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid, jasmonates, ethylene and inhibitors of its synthesis and action on different phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L.

#### Key words:

*Medicago sativa* L., *in vitro* somatic embryogenesis, plant growth regulators.

### 1. Wstęp

Somatyczna embriogeneza jest procesem, w wyniku którego z komórek somatycznych tworzą się zarodki morfologicznie i fizjologicznie podobne do zarodków zygicznych. Proces ten może zachodzić w warunkach *in vivo* lub *in vitro*. Występowanie tego procesu w warunkach naturalnych zostało po raz pierwszy opisane przez Strasburgera w 1978 r. (1) jako embrionia przybyszowa. Somatyczną embriogenezę w warunkach *in vivo* stwierdzono m.in. u *Ranunculus sceleratus*, *Malaxis paludosa*, *Bryophyllum calycinum* i *Kalanchoe diargremontiana* (2).

#### Adres do korespondencji

Jan Kępczyński,  
Zakład Fizjologii Roślin,  
Uniwersytet Szczeciński,  
ul. Wąska 13,  
74-415 Szczecin

W literaturze najczęściej podawano, że somatyczna embriogeneza w kulturach *in vitro* została pierwszy raz opisana przez Stewarda w 1958 r. i Reinerta w 1959 r. (1). Jednak obecnie uważa się, że pierwszeństwo należy się raczej Levinowi, który w 1947 r. otrzymał siewki marchwi wykorzystując kultury *in vitro* marchwi z tkanek traktowanych kwasem  $\alpha$ -naftalenoocetowym (NAA). Somatyczna embriogeneza może zachodzić u roślin jednoliściennych i dwuliściennych oraz nagolazłkowych. W 1995 r. Brown i wsp. (2) zamieścili w pracy wykaz 180 gatunków dwuliściennych roślin zielnych, które w warunkach *in vitro* tworzyły somatyczne zarodki.

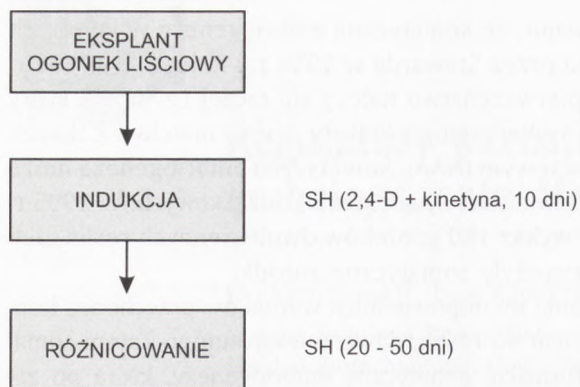
Somatyczne zarodki po zapewnieniu im odpowiednich warunków przechodzą konwersję w rośliny o fenotypie podobnym do roślin, dawców eksplantów. Zatem somatyczne komórki posiadają pełną informację genetyczną embriogenezy, która po działaniu określonych czynników w warunkach *in vivo* lub *in vitro* jest wykorzystywana do generowania zarodków, a następnie do realizacji pełnego cyklu życiowego rośliny.

Indukcja somatycznej embriogenezy wiąże się z przeprogramowaniem komórki i uruchomieniem embriogenicznego programu. Rozróżnia się dwa typy komórek. Pierwszy typ to – zaindukowane embriogenicznie zdeterminowane komórki (IEDC) to komórki, które nie były embriogeniczne i w wyniku indukcji stały się embriogeniczne. Drugi typ to komórki preembriogenicznie zdeterminowane (PEDC), np. komórki zarodka. Zarówno komórki IEDC jak też PEDC są wykorzystywane do produkcji somatycznych zarodków. Po zapewnieniu warunków umożliwiających podziały komórkom PEDC, na tkance eksplantu powstają zarodki w procesie określanym jako bezpośrednia embriogeneza. Natomiast komórki nieembriogeniczne podczas fazy indukcji embriogeniczności ulegają wielokrotnym podziałom w konsekwencji najpierw powstaje kalus, a następnie somatyczne zarodki. Somatyczne zarodki tworzą się zatem w wyniku embriogenezy pośredniej. Możliwość zachodzenia embriogenezy w warunkach *in vitro* ma ogromne znaczenie w badaniach podstawowych oraz dla praktyki. Somatyczne zarodki są wykorzystywane w formie tzw. sztucznych nasion do rozmnażania wegetatywnego roślin na dużą skalę. Jako sztuczne nasiona wykorzystywane są uwodnione lub wysuszone somatyczne zarodki, albo zarodki somatyczne uwodnione lub wysuszone i umieszczone w kapsułce żelowej.

## 2. Embriogeneza w kulturach *in vitro* lucerny

Pierwsze doniesienie dotyczące somatycznej embriogenezy w kulturach *in vitro* lucerny zostało opublikowane w 1972 r. przez Saundersa i Bingham (2). Do tej pory opublikowano kilkadziesiąt prac na temat embriogenezy lucerny, wykorzystywano różne pożywki oraz różne gatunki, odmiany lub wyselekcjonowane linie. Somatyczne zarodki lucerny otrzymywano na drodze pośredniej jak też bezpośredniej embriogenezy.

W zależności od sposobu produkcji zarodków stosuje się różne pożywki oraz wyróżnia się dwie lub więcej faz embriogenezy. We wszystkich metodach najważniejszą jest pierwsza, a zatem faza indukcji embriogeniczności.

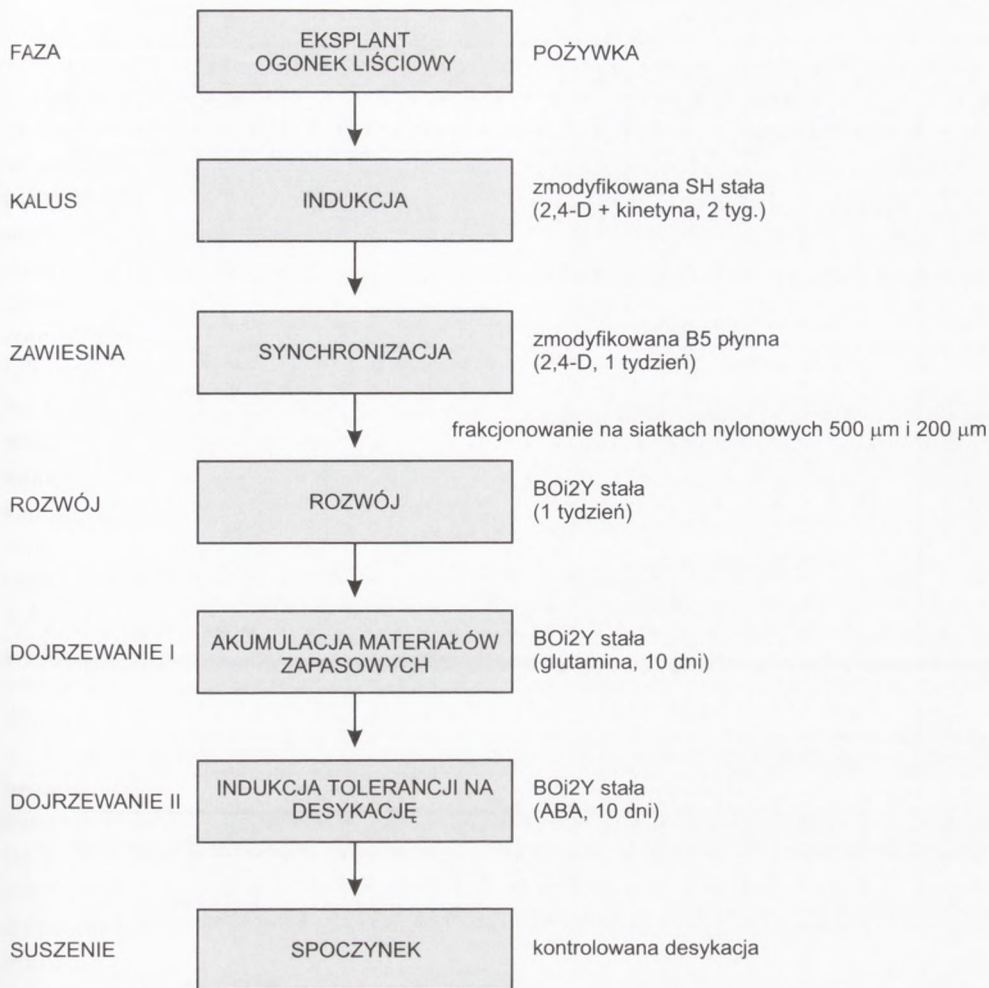


Rys. 1. Produkcja somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. na stałych pożywkach metodą I (3).

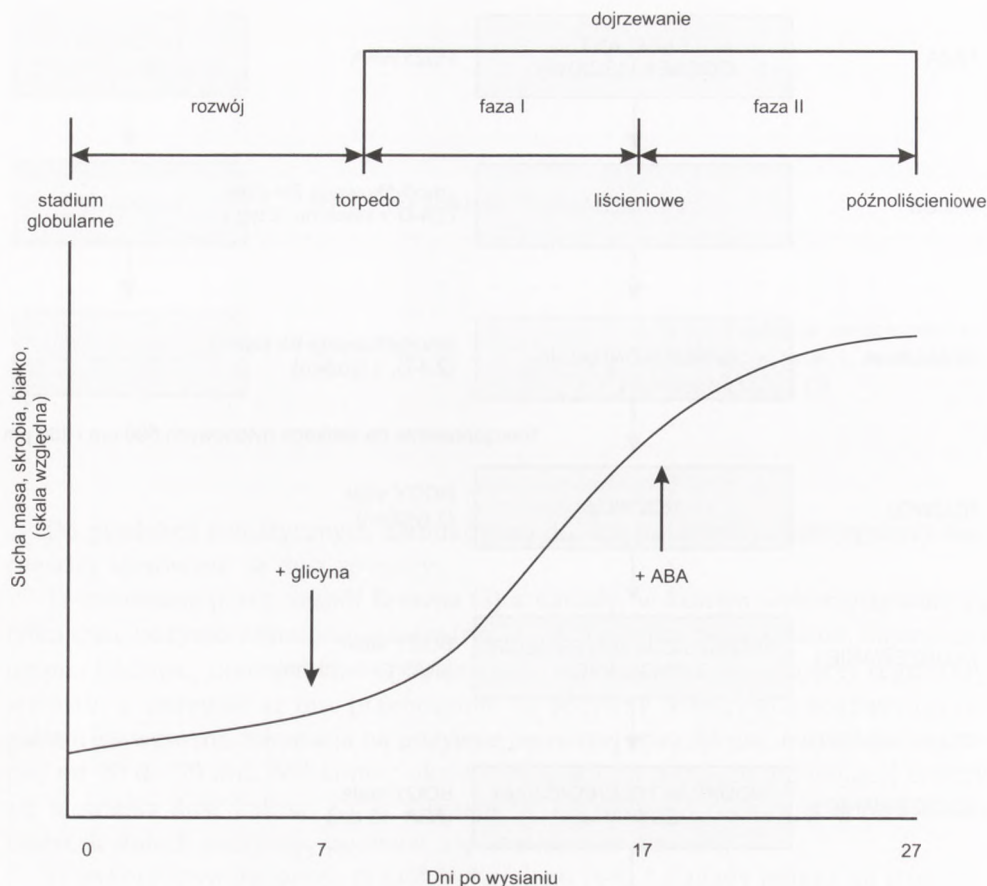
Do produkcji somatycznych zarodków na drodze pośredniej embriogenezy najczęściej stosowane są dwa sposoby:

1) stosowany przez zespół Browna (3) z Kanady, w którym wykorzystywane są tylko dwie pożywki zestalone agarowo (rys. 1). W metodzie tej eksplanty, najczęściej ogonki liściowe, umieszczane są na pożywce indukującej, zawierającej regulatory wzrostu, a następnie są one przenoszone na pożywkę różnicującą pozbawioną regulatorów wzrostu. Inkubacja na pożywce pierwszej trwa 10 dni, natomiast na drugiej od 20 do 50 dni. Pod koniec okresu inkubacji na pożywce indukującej tworzy się niewielka ilość kalusa. Kalus rozrasta się na pożywce różnicującej i po około czterech dniach zaczynają pojawiać się somatyczne zarodki;

2) wykorzystywany przez zespół McKersiego (4-6) z Kanady polega na stosowaniu 4 lub 5 pożywek w tym jednej płynnej (rys. 2). Procedura obejmuje kilka etapów: indukcję, synchronizację, rozwój zarodka, kumulację materiałów zapasowych, indukcję tolerancji na desykcję i suszenie. W fazie indukcji tworzy się kalus, w którym rozproszone są proembriogeniczne komórki. Po przeniesieniu do pożywki płynnej dochodzi do rozbicia kalusa uwolnienia tych komórek oraz namnożenia komórek. Pod koniec okresu inkubacji w zawieszynie znajdują się agregaty niezróżnicowanego kalusa, anormalne zarodki, skupiska proembriogenicznych komórek, które są zsynchronizowane w swoim dalszym rozwoju oraz duże pojedyncze komórki w kształcie banana (6). Po frakcjonowaniu zawieszyny w następnym etapie wykorzystywana jest tylko frakcja proembriogeniczna (osadzona na siatce 200  $\mu\text{m}$ ), która jest wysiewana na pożywkę stałą, odpowiednią dla rozwoju zarodków. Po około 4 dniach pojawiają się zielone zarodki w stadium globularnym i sercowatym, a po 7 dniach zarodki w stadium torpedy (rys. 3). Zarodki należy przenieść na taką samą pożywkę wzbogaconą w glutaminę. Podczas inkubacji na tej pożywce przez około 10 dni zachodzi intensywny wzrost zarodków związany z kumulacją materiałów zapasowych. Umownie fazę tę określono jako pierwszą fazę dojrzewania. W drugiej fazie dojrzewania zachodzi indukcja tolerancji na desykcję. Następnie zarodki na-

Rys. 2. Produkcja somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. metodą II (5).

leży wysuszyć do wilgotności około 10-15%. Suszenie jest stopniowe i polega na przetrzymywaniu zarodków przez jeden dzień kolejno w eksykatorach w atmosferze o coraz mniejszej wilgotności. W wyniku dehydratacji uzyskuje się zarodki znajdujące się w spoczynku względnym, który ustępuje dopiero po zapewnieniu im odpowiednich warunków dla kiełkowania.



Rys. 3. Rozwój i dojrzewanie somatycznych zarodków *Medicago sativa* L. metodą II (5).

### 3. Czynniki decydujące o embriogenezie lucerny

Wiele endogennych i egzogennych czynników wpływa na somatyczną embriogenezę w kulturach *in vitro* lucerny (2,5). Zasadnicze znaczenie ma genotyp rośliny. Stwierdzono różną zdolność do embriogenezy u różnych gatunków, odmian oraz linii. Istotne znaczenie dla omawianego procesu ma również rodzaj i stężenie regulatorów w pożywce indukującej. Ponadto wiele innych czynników, np. stan fizjologiczny rośliny donora oraz zawartość azotu w pożywce indukującej i regenerującej, a także jakość i natężenie światła wpływa na produkcję somatycznych zarodków.

Spośród wymienionych czynników niewątpliwie regulatory wzrostu pełnią zasadniczą funkcję decydując o uzyskaniu embriogeniczności oraz przebiegu i wydajności embriogenezy.

### 3.1. Auksyny

Indukcja embriogeniczności jest możliwa dzięki zastosowaniu auksyny w pożywce indukującej. Zatem należą one do najważniejszych regulatorów uczestniczących w kontroli somatycznej embriogenezy. Są one niezbędne do indukcji i zwykle niepotrzebne podczas dalszych stadiów embriogenezy. Dotychczas najczęściej wykorzystywaną auksyną był kwas dwuchlorofenoksyoctowy (2,4-D) w stężeniu od 4,5 do 22,5  $\mu\text{M}$  (3). Indukuje on zarówno powstawanie kalusa jak też embriogenezę. Indukcję embriogeniczności obserwowano również pod wpływem kwasu 2,4,5-trójklorofenoksyoctowego (2,4,5-T). Kwas indolilo-3-octowy (IAA) lub NAA nie indukowały lub indukowały ją w minimalnym stopniu, natomiast indukowały powstawanie kalusa. Dlatego są one wykorzystywane do namnażania kalusa lub kultury zawiesin komórkowych niezdolnych do tworzenia zarodków. Okazało się, że czas traktowania auksyną ma istotne znaczenie. Jeśli stosowano wysokie stężenie wtedy wystarczył krótki okres, jeśli niskie wtedy należało przedłużyć traktowanie. Stwierdzono, że wystarczy zastosować w pożywce indukującej 2,4-D przez 3-6 dni, aby powstały zarodki na zestalonej agarze pożywce różnicującej. Wenzel i Brown (7) wykazali, że 2,4-D indukuje podziały komórek kambium oraz epidermy i subepidermy. W wyniku podziałów komórek kambium powstawał niembriogeniczny kalus. Natomiast kalus embriogeniczny tworzył się w konsekwencji podziałów komórek epidermy i subepidermy.

Przypuszcza się, że działanie 2,4-D związane jest ze stymulacją działania pompy protonowej, co prowadzi do polaryzacji membran oraz umożliwia funkcjonowanie kanałów, np. odpowiedzialnych za transport jonów potasu do komórek. Na korzyść tej koncepcji przemawia fakt, że podwyższenie stężenia jonów potasu w pożywce indukującej spowodowało znaczne zwiększenie produkcji zarodków (5). Wykazano, że prolina uczestniczy w metabolizmie puryn, stymuluje produkcję zarodków oraz podwyższa działanie jonów potasu. W związku z tym pojawiła się sugestia, że jony potasu regulują metabolizm puryn.

### 3.2. Cytokininy

Regulatory te, odpowiedzialne za podziały komórkowe roślin, są również wykorzystywane w fazie indukcji somatycznej embriogenezy. Najczęściej stosowana była kinetyna w zakresie od 1-5  $\mu\text{M}$ . Znacznie rzadziej wykorzystywano benzyloadeninę (BA), zeatynę lub jej rybozyd. Kinetyna zastosowana podczas indukcji w znacznym stopniu zwiększa produkcję zarodków na pożywce różnicującej. Meijer i Brown (3) wykazali około pięciokrotne podwyższenie produkcji zarodków w wyniku aplikacji kinetyny podczas indukcji.

### 3.3. Kwas abscysynowy (ABA)

Kwas abscysynowy (ABA), znany inhibitor wzrostu, stosowano zarówno w pożywce indukującej jak też różnicującej w metodzie I oraz w indukującej, w zawiesinie i podczas dojrzewania zarodków w metodzie II. ABA obecny w pożywce indukującej hamował tworzenie zarodków na pożywce różnicującej (8). Zastosowanie tego fitohormonu podczas drugiej fazy, a zatem w pożywce różnicującej, również zahamowało tworzenie zarodków (9). Zatem egzogenny ABA hamował indukcję embriogeniczności wywołaną przez 2,4-D oraz proces embriogenezy. Być może wpływ ABA jest związany z inhibicją podziałów komórkowych.

Inhibitor biosyntezy ABA, fluridon, obecny w pożywce indukującej lub różnicującej (metoda II) obniżył produkcję zarodków (10). Można zatem przypuszczać, że pewna ilość endogennego ABA jest potrzebna zarówno podczas indukcji embriogeniczności, jak też do prawidłowego przebiegu embriogenezy. Nie można jednak wykluczyć, innego ubocznego wpływu fluridonu nie związanego z regulacją biosyntezy ABA.

Udział ABA w embriogenezie można ocenić bardziej precyzyjnie wykorzystując metodę drugą, ponieważ umożliwia ona wyodrębnienie kilku stadiów embriogenezy. ABA zastosowany podczas indukcji również zahamował tworzenie zarodków na pożywce przewidzianej dla rozwoju zarodków (dane nie publikowane). Obecność ABA w zawiesinie spowodowała zmniejszenie jej masy prawdopodobnie w wyniku inhibicji podziałów komórkowych i w konsekwencji obniżenie produkcji zarodków (4). Po wysuszeniu zarodków w przepływie powietrza przez 24 h i umieszczeniu ich na bibule wysyczonej wodą nie ulegały one konwersji w rośliny. Podobnie nie otrzymano roślin z zarodków jeśli ABA był obecny w zawiesinie. Jeśli ABA podano podczas rozwoju zarodków, wtedy zarodki pomimo wysuszenia uległy konwersji. Wyniki te wskazują, że ABA jest odpowiedzialny za indukcję tolerancji na desykcję (4). Somatyczne zarodki są wrażliwe na ABA w stadium pomiędzy torpedo a wczesnym stadium liścieniowym. Wcześniejsze lub późniejsze traktowanie ABA nie indukuje tolerancji na desykcję. Zamiast ABA można zastosować szok termiczny lub częściowe suszenie lub stres osmotyczny. Takie traktowanie stymuluje w zarodkach syntezę endogennego ABA odpowiedzialnego za indukcję tolerancji na desykcję (11,12). Możliwość indukcji tolerancji na dehydratację ma ogromne znaczenie dla technologii produkcji sztucznych nasion, ponieważ umożliwia ich wysuszenie do wilgotności około 10-15% bez ryzyka utraty zdolności do kiełkowania. Możliwe jest zatem przechowywanie i dystrybucja suchych zarodków.

Obecnie uważa się, że egzogenny ABA spełnia kilka istotnych funkcji w procesie embriogenezy. Jedną z nich jest inhibicja przedwczesnego kiełkowania zarodków w kulturach. Zarodki somatyczne w odróżnieniu od zygotycznych nie posiadają w swoim rozwoju fazy spoczynku. Przetrzymany zbyt długo na pożywce różnicującej (metoda I) lub w fazie pierwszej dojrzewania (metoda II) ulegają konwersji w siewki. Druga funkcja polega na indukcji genetycznego programu w zarodku, któ-

ry inicjuje biochemiczne i fizyczne zmiany wywołując tolerancję na dehydratację. McKersie i wsp. (5) wykazali, że indukcja tolerancji na desykcję zarodków lucerny związana jest z kumulacją witaminy E.

### 3.4. Kwas jasmonowy (JA) i jego ester (JA-ME)

Związki jasmonowe, kwas jasmonowy (JA) i jego ester (JA-ME), wpływają na niektóre procesy podobnie jak kwas abscysynowy, natomiast w pewnych procesach działają antagonistycznie (13). Związki jasmonowe zastosowane podczas indukcji hamowały tworzenie zarodków na pożywce różnicującej, co wskazuje na inhibicję indukcji embriogeniczności wywołaną przez 2,4-D (8). Podane w pożywce różnicującej również hamowały tworzenie zarodków (8,9). Związki jasmonowe charakteryzowały się mniejszą aktywnością niż kwas abscysynowy. Przypuszcza się, że związki jasmonowe nie indukują tolerancji na desykcję (dane nie publikowane).

### 3.5. Gibereliny

Niewiele jest danych na temat wykorzystania giberelin, znanych stymulatorów wzrostu, w regulacji somatycznej embriogenezy. Stwierdzono, że u niektórych gatunków podwyższają one wydajność, a u innych hamują ten proces. Kwas giberelowy ( $GA_3$ ) podany podczas indukcji podwyższył liczbę uzyskanych zarodków na pożywce różnicującej, co sugeruje jego udział w indukcji (14).  $GA_3$  w pożywce różnicującej zdecydowanie podwyższył liczbę otrzymanych zarodków aż o 300% w stosunku do kombinacji bez gibereliny. Paklobutrazol, inhibitor biosyntezy giberelin, spowodował obniżenie liczby otrzymanych zarodków niezależnie czy zastosowano go podczas indukcji, czy drugiej fazy. Dane te wskazują na udział endogennych giberelin w regulacji somatycznej embriogenezy; endogenne gibereliny są potrzebne podczas rozwoju zarodków oraz, być może, podczas fazy indukcji.

### 3.6. Etylen

Zdolność do produkcji etylenu, najprostszego pod względem budowy fitohormonu, zwiększała się podczas pierwszych 10 dni na pożywce indukującej, a następnie znacznie obniżała się w miarę wydłużania inkubacji na pożywce różnicującej (15). Jony kobaltu, które hamują przekształcanie prekursora etylenu, ACC, do etylenu obniżały jego produkcję podczas indukcji. Zastosowanie ich podczas indukcji nie wpłynęło na tworzenie zarodków na pożywce różnicującej. Jony kobaltu hamowały produkcję etylenu i tworzenie zarodków, gdy były obecne podczas drugiej fazy. Wyniki te sugerowały, że wysoka produkcja etylenu podczas indukcji nie ma znaczenia



dla tego procesu. Fitohormon ten jest jednak potrzebny podczas procesu embriogenezy. 2,5-norbornadien (NBD), specyficzny inhibitor wiązania etylenu do jego receptorów, nie wpływał istotnie na proces indukcji embriogeniczności, natomiast hamował tworzenie zarodków na pożywce różnicującej (16). Zatem działanie endogennego etylenu jest niepotrzebne podczas indukcji, a niezbędne dla rozwoju i dojrzewania zarodków.

#### 4. Podsumowanie

Kolejne stadia rozwoju somatycznego zarodka uzależnione są od obecności różnych regulatorów wzrostu. Znaczenie poszczególnych regulatorów w embriogenezie można ocenić na podstawie ich wpływu na embriogeniczność i proces embriogenezy. Przydatna w tych badaniach jest możliwość stosowania inhibitorów biosyntezy lub działania fitohormonów. Wybór metody otrzymywania somatycznych zarodków decyduje o stopniu dokładności uzyskanej informacji. Zastosowanie metody pierwszej pozwala określić ich udział w indukcji embriogeniczności. Wpływ na proces embriogenezy opiera się na ocenie liczby uzyskiwanych zarodków w obecności danego regulatora na pożywce różnicującej. Oceniany jest zatem ostateczny wynik i nie wiadomo, który etap rozwoju lub dojrzewania zarodków podlegał kontroli. Bardziej przydatna zarówno w badaniach jak też dla celów praktycznych jest metoda druga. Umożliwia ona określenie udziału regulatorów w poszczególnych stadiach embriogenezy. Dlatego badania dotyczące znaczenia związków jasmonowych, giberelin i etylenu w procesie embriogenezy lucerny należy poszerzyć wykorzystując metodę drugą.

#### Literatura

1. Merkle S. A., Parrot W. A., Flinn B. S., (1995), *In vitro Embryogenesis in Plants*, Ed. Thorpe T. A., 51-203, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. 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.
3. Meijer E. G. M., Brown D. C. W., (1987), *Physiol. Plant.*, 6, 591-596.
4. Senaratna T., McKersie B. D., Bowley S. R., (1990), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 26, 85-90.
5. 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.
6. McKersie B. D., Senaratna T., Bowley S. R., Brown D. C. W., Krochko J. E., Bewley S.R., (1989), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 2, 1183-1188.
7. Wenzel C. L., Brown C. W., (1991), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27P, 190-196.
8. Kępczyński J., Florek I., (1997), *Basic and Applied Aspects of Seeds Biology*, Eds. Ellis R. H., Black M., Murdoch A. J., Hong T. D., 137-140, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
9. Rudaś., Kępczyński J., Kępczyńska E., (2001), *Acta Physiol. Plant.*, 23, 103-107.
10. Florek I, Kępczyński J., Kępczyńska E., (1998), *Materiały Ogólnopolskiej Konferencji: Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*, Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków, 61-84.
11. Senaratna T., Mc Kersie B. D., Bowley S. R., (1989), *Plant Science*, 65, 253-259.
12. McKersie B. D., Senaratna T., Bowley S. R., (1990), *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, 17, 199-207.

13. Białecka B., Kępczyński J., (1998), Wiad. Bot., 42, 61-78.
14. Ruduś I., Kępczyńska E., Kępczyński J., (2001), Plant. Growth Regul. (w druku).
15. Meijer E. G. M., (1989), J. Exp. Bot., 213, 479-484.
16. Kępczyński J., McKersie B. D., Brown C. W., (1992), J. Exp. Bot., 254, 1199-1202.