



## Regeneracja roślin *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. drogą bezpośredniej somatycznej embriogenezy

Małgorzata D. Gaj

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice

### Regeneration of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. plants via direct somatic embryogenesis

#### Summary

In *Arabidopsis* biotechnology plants are regenerated *in vitro* via shoot organogenesis induced in callus derived from different somatic tissues. An alternative way of *in vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis has not been applied in *Arabidopsis* so far. Recently, it was found that development of *Arabidopsis* somatic embryos can be induced in the culture of immature zygotic embryos and that the callus phase is not necessary for the initiation of embryogenesis. The aim of the presented research was to determinate the *in vitro* culture conditions enabling high efficiency of somatic embryo induction and their conversion into plants. The influence of induction medium composition including liquid or agar medium, type and concentration of auxin, carbohydrates and ammonium sources as well as duration of auxin treatment of explants on DSE efficiency were evaluated. Advantages of described regeneration system via DSE are as follows: short time needed to induce somatic embryos (10-15 days), high efficiency of the process (more than 80% explants responded), numerous embryos produced per explant (on average 17) and high percentage of embryo conversion into fertile plants (70-80%).

#### Key words:

*Arabidopsis thaliana* *in vitro* culture, direct somatic embryogenesis, immature embryo culture, *in vitro* plant regeneration, somatic embryo conversion.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata D. Gaj,  
Katedra Genetyki,  
Uniwersytet Śląski,  
ul. Jagiellońska 28,  
40-032 Katowice;  
e-mail:  
mmdgaj@us.edu.pl

## 1. Wstęp

W genetyce i biotechnologii roślin wykorzystywane są zarówno ważne gospodarczo gatunki uprawne, jak również organizmy modelowe, nie przedstawiające walorów użytkowych, jednakże posiadające cenne w badaniach biologicznych cechy. Takim obiektem modelowym w wielu dyscyplinach współczesnej biologii jest pospolity chwast, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (rzodkiewnik pospolity). Gatunek ten jest szczególnie intensywnie badany w biologii molekularnej, stając się w ostatnich latach modelem w analizie genomu roślin wyższych (1-3). Podstawą idei wykorzystania *Arabidopsis* jako organizmu modelowego w genetyce jest prostota budowy genomu tej rośliny, ułatwiająca identyfikację genów, a następnie znalezienie ich odpowiedników w roślinach ważnych użytkowo.

Szerokie możliwości badawcze jakie w genetyce komórek somatycznych stwarza *Arabidopsis*, dostrzeżono ponad 20 lat temu opracowując metodę regeneracji roślin w kulturze tkanek somatycznych (4). Jednakże pomimo upływu wielu lat, stosowane dla potrzeb transformacji czy mutagenyzy *in vitro* metody regeneracji roślin *Arabidopsis* oparte są wyłącznie na organogenezie pędów z kalusa (5-7), natomiast nie zostały opracowane systemy pozwalające na efektywne regenerowanie roślin drogą somatycznej embriogenezy (SE).

Eksplantatami szczególnie przydatnymi do indukowania różnych typów morfogenezy *in vitro* są u *A. thaliana* niedojrzałe zarodki zygocytne. W przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach wykazano, że w kulturze tych eksplantatów można również indukować procesy somatycznej embriogenezy. W opisywanych dotąd metodach indukcji SE wydajność procesu była względnie niska, ograniczona genotypowo, a rozwój zarodków poprzedzało długotrwałe wyprowadzanie embriogennej kultury kalusa (8-11). Powstawanie zarodków somatycznych drogą bezpośredniej somatycznej embriogenezy (DSE – *direct somatic embriogenesis*) wykorzystano do ustalenia embriogennej linii kalusa (12). Ostatnio wykazano także możliwość regeneracji roślin *Arabidopsis* drogą DSE stwierdzając, że istotny wpływ na efektywność indukcji zarodków somatycznych w tym typie morfogenezy *in vitro* ma stadium rozwojowe eksplantatów – niedojrzałych zarodków zygocytnych (13).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wybranych czynników kultury *in vitro* na efektywność procesu indukcji DSE w kulturze niedojrzałych zarodków zygocytnych. W pracy zbadano również zdolności somatycznych zarodków do konwersji w rośliny oceniając przydatność proponowanej metody jako nowego systemu regeneracji roślin *Arabidopsis* w warunkach *in vitro*.

## 2. Materiał i metody

Eksplantaty do kultury *in vitro*, którymi były niedojrzałe zarodki zygocytne, pobierano z roślin *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotypu Columbia. Nasiona wysiewa-

no do doniczek z ziemią ogrodową zmieszaną z wermikulitem w stosunku 1:1. Rozwój roślin przebiegał w kontrolowanych warunkach, w pokoju hodowlanym w temperaturze 20-23°C, przy natężeniu światła  $40 \mu\text{m} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  przez 16 godzin na dobę i wilgotności 60-70%.

Eksplantatami do indukcji DSE były niedojrzałe zarodki zgotyczne o wielkości od 300 do 500  $\mu\text{m}$  posiadające wyraźnie wykształcone, zagięte liścienie. Łuszczyzny sterylizowano przez 15 min w 20% wodnym roztworze preparatu ACE, będącego roztworem podchlorynu sodu, z dodatkiem 2-3 kropli/100 ml środka powierzchniowo czynnego TWEEN 80, a następnie trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Niedojrzałe zarodki izolowano z niedojrzałych nasion za pomocą igieł preparacyjnych pod mikroskopem stereoskopowym.

Indukcja bezpośredniej somatycznej embriogenezy następowała na pożywce indukcyjnej E o składzie podstawowym mikro-, makroelementów i witamin B5 (14) z dodatkiem 20 g/L sacharozy, pH 5,8. Pożywkę stałą zestalano 2 g/L gelritu. Efektywność DSE oceniano w zależności od rodzaju i stężenia zastosowanej w pożywce auksyny: 2,4-D (kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy) lub NAA (kwas  $\alpha$ -naftylooctowego). W doświadczeniu nad wpływem rodzaju cukru na proces DSE sacharozę zastąpiono 100 mM fruktozy, maltozy lub glukozy. Analizowano także wpływ stanu skupienia pożywki indukcyjnej (płynna i stała) oraz warunków świetlnych (indukcja przy 16-godzinym naswietleniu lub w ciemności) na efektywność DSE. Indukcja DSE następowała w plastikowych płytkach Petriego o średnicy 3 cm zawierających stałą lub płynną pożywkę indukcyjną. Kulturę na pożywce płynnej prowadzono na wytrząsarce (100 rpm).

Z eksplantatów, u których nastąpiła indukcja somatycznej embriogenezy, izolowano somatyczne zarodki i przenoszono na pożywkę MS20 zawierającą mikro-, makroelementy i witaminy wg Murashige i Skooga (15), 20 g/L sacharozy, 2 g/L gelritu. W doświadczeniu nad wpływem kwasu giberelinowego na proces konwersji pożywkę MS20 wzbogacano 1 mg/L  $\text{GA}_3$ .

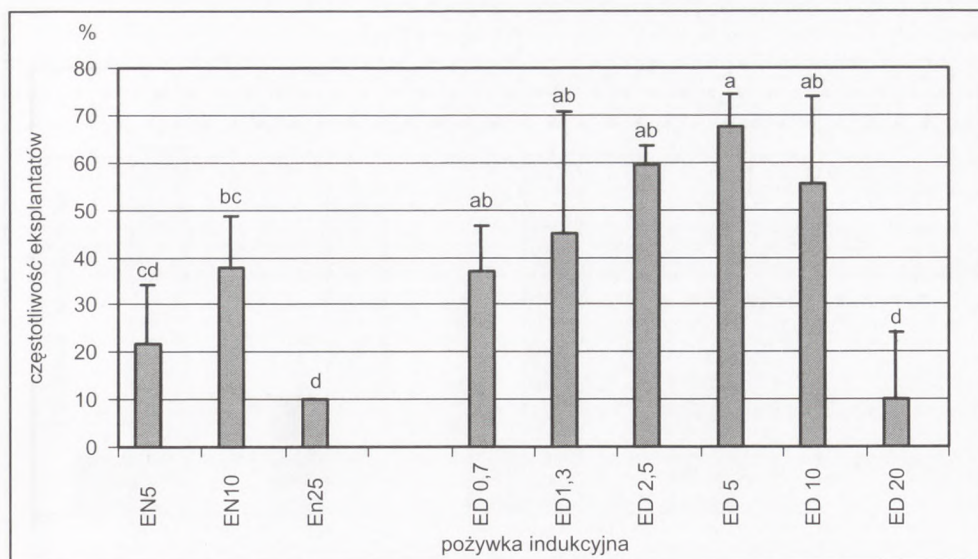
Indukcja DSE i konwersja zarodków somatycznych w rośliny prowadzona była w pokoju hodowlanym o temperaturze  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  i oświetleniu  $20 \mu\text{m} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  przez 16 godz./dobę.

Istotność różnic pomiędzy badanymi kombinacjami doświadczalnymi analizowano testem LSD dla poziomu istotności  $P < 0,05$ , przy zastosowaniu programu komputerowego STATISTICA 5.1.97 firmy STATSOFT INC.

Ocenę efektywności DSE w badanych kombinacjach eksperymentalnych oparto na wynikach 2-3 doświadczeń, z których każde obejmowało analizę reakcji eksplantatów wzrastających na 3-10 płytkach Petriego.

### 3. Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonej analizie efektywności DSE, mierzonej częstotliwością eksplanatów tworzących somatyczne zarodki na stałych pożywkach indukcyjnych za-

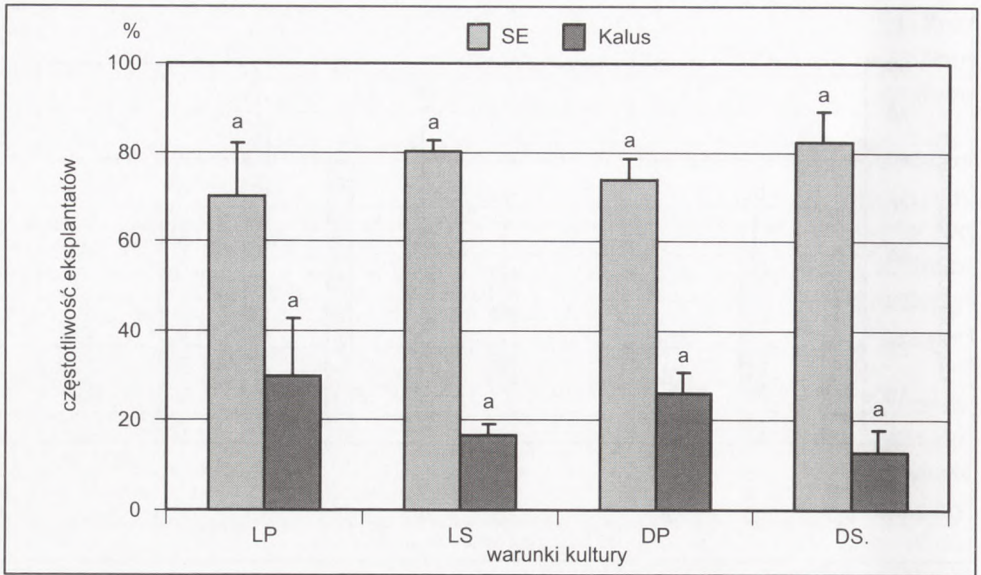


Rys. 1. Efektywność DSE na pożywkach indukcyjnych zawierających różne stężenie NAA (EN) lub 2,4-D (ED), liczba przy symbolu pożywki oznacza stężenie auksyny w  $\mu\text{M}$ ; wartości oznaczone tymi samymi literami nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .

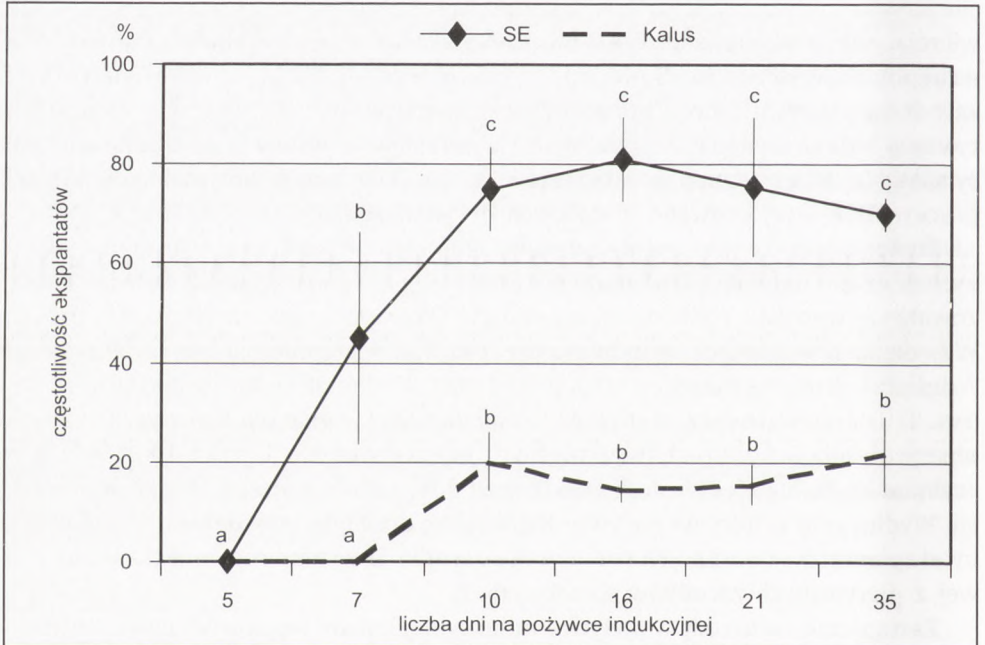
wierających różne stężenia 2,4-D lub NAA wykazano, że maksymalna indukcja DSE następowała w obecności 5  $\mu\text{M}$  2,4-D. Na pożywce tej (ED 5) rozwój somatycznych zarodków obserwowano u ponad 67% eksplantatów (rys. 1). Znacznie mniej efektywny w indukowaniu DSE okazał się NAA, indukując powstawanie zarodków u maksymalnie 37,6% eksplantatów. Stężenie 5  $\mu\text{M}$  2,4-D uznano za optymalne do indukcji procesu DSE i zastosowano w dalszych doświadczeniach.

Stwierdzono, że niezależnie od stanu skupienia pożywki oraz warunków świetlnych w czasie indukcji eksplantaty wzrastające w obecności 5  $\mu\text{M}$  2,4-D charakteryzowały się wysoką i zbliżoną efektywnością DSE wynoszącą od 70 do 80% (rys. 2). W badaniach wykazano, że indukcja procesu DSE następuje bardzo szybko. Już po 7 dniach kultury na pożywce ED 5 ponad 40% eksplantatów inicjowało proces DSE (rys. 3). Dalszy wzrost częstości eksplantatów tworzących somatyczne zarodki obserwowano w kulturach indukowanych na pożywce ED 5 przez 10-21 dni, przy czym maksymalną efektywność DSE (ponad 80%) zanotowano po 16-dniowej indukcji. Wydłużanie kultury na pożywce indukcyjnej do 35 dni powodowało spadek liczby eksplantatów tworzących somatyczne zarodki w wyniku rozwoju tkanki kalusowej z pierwotnych zarodków somatycznych.

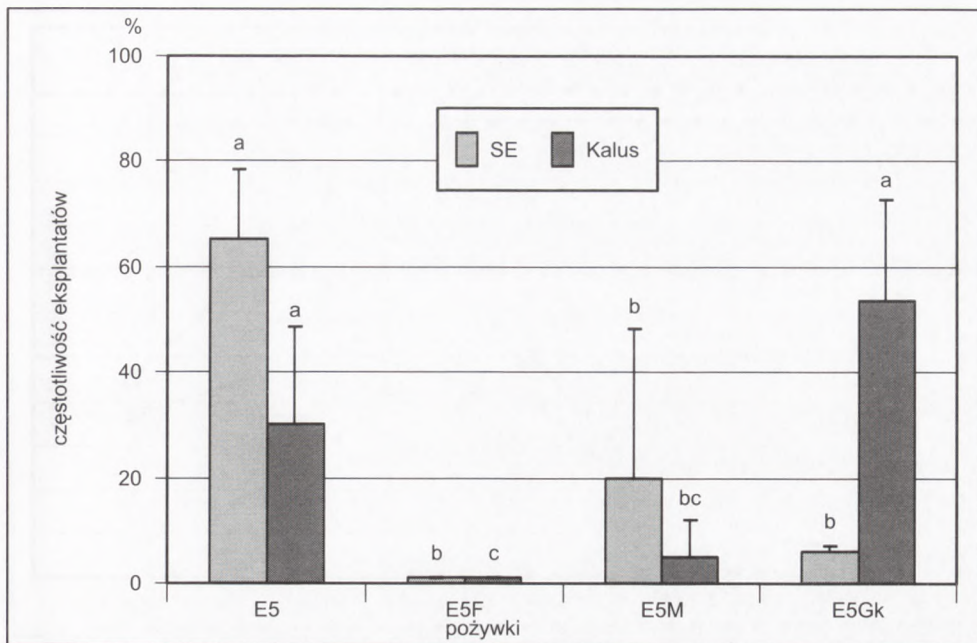
Zastąpienie sacharozy w pożywce indukcyjnej innymi węglowodanami spowodowało obniżenie lub zahamowanie zdolności eksplantatów do DSE (rys. 4). Na pożywce z maltozą lub glukozą zarodki wytwarzało odpowiednio 20 i 6% eksplantatów, natomiast fruktoza powodowała zamieranie eksplantatów.



Rys. 2. Częstotliwość eksplantatów tworzących somatyczne zarodki lub kalus na pożywce ED 5 stałej (S) lub płynnej (P) w zależności od warunków świetlnych w czasie indukcji DSE (L – światło; D – ciemność); wartości oznaczone tymi samymi literami, w obrębie tej samej kombinacji, nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .



Rys. 3. Częstotliwość eksplantatów wytwarzających somatyczne zarodki lub kalus w zależności od czasu kultury na pożywce indukcyjnej E5; wartości oznaczone tymi samymi literami, w obrębie tej samej kombinacji, nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .

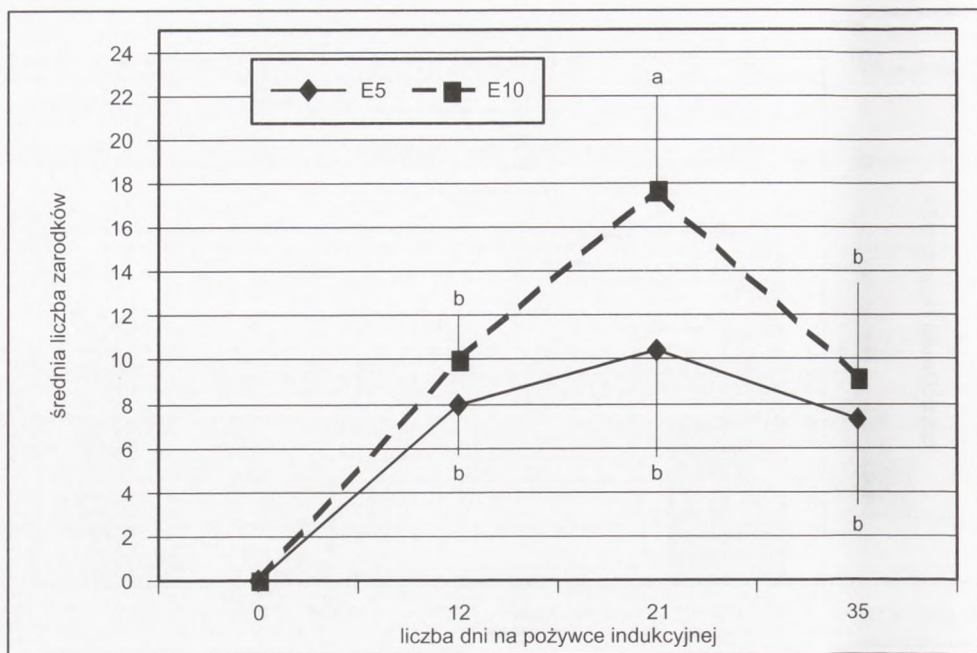


Rys. 4. Częstotliwość eksplantatów wytwarzających somatyczne zarodki lub kalus na pożywkach indukcyjnych zawierających różne węglowodany: E5 – 20 g/L sacharozy; E5F – 100 mM fruktozy, E5M – 100 mM maltozy; E5Gk – 100 mM glukozy; wartości oznaczone tymi samymi literami, w obrębie tej samej kombinacji, nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .

Stwierdzono, że długość kultury eksplantatów na pożywce indukcyjnej wpływała nie tylko na poziom indukcji DSE, lecz również na liczbę zarodków somatycznych wytwarzanych przez eksplantat. Maksymalną średnią liczbę zarodków/eksplantat zanotowano po 21 dniach kultury. Zaobserwowano ponadto, że podniesienie stężenia 2,4-D w pożywce z 5 do 10  $\mu\text{M}$  powoduje wzrost średniej liczby zarodków z 10 do blisko 18 (rys. 5).

Powstające na stałej pożywce ED 5 zarodki somatyczne po przeniesieniu na pożywkę bezhormonalną wytwarzały pędy i korzenie, przy czym częstotliwość konwersji w rośliny była wysoka (ponad 70%) i niezależna od obecności  $\text{GA}_3$  w pożywce (rys. 6).

W pracy stwierdzono, że obok odpowiedniego stadium rozwojowego niedojrzałych zarodków zygocycznych (13) o wysokiej efektywności indukcji DSE decyduje ekspozycja eksplantatów na działanie 2,4-D, która przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$  prowadzi do rozwoju zarodków somatycznych u ponad 70% eksplantatów. Wykazano, że zwiększenie stężenia 2,4-D w standardowej pożywce indukcyjnej do 10  $\mu\text{M}$  podniosło o blisko 50% średnią liczbę zarodków uzyskiwanych z eksplantatu. Podobny wzrost liczby zarodków zygocycznych wytwarzanych przez eksplantat po podniesieniu stężenia 2,4-D z 5 do 15  $\mu\text{M}$  obserwowano u *Arachis hypogea* (16).

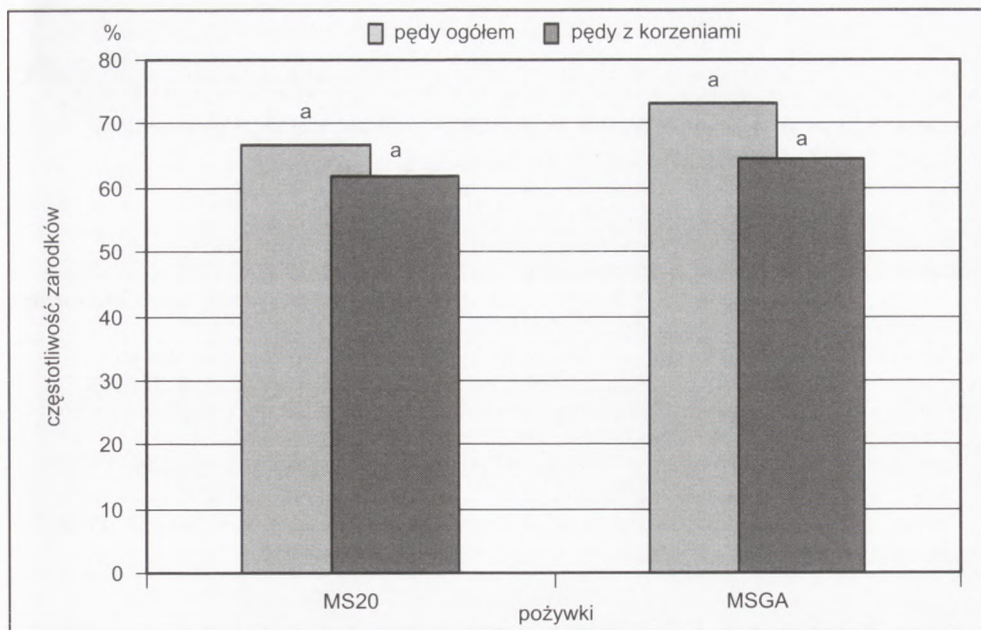


Rys. 5. Średnia liczba zarodków somatycznych wytwarzanych przez eksplantat w zależności od czasu kultury i zawartości 2,4-D w pożywce indukcyjnej (E5 – 5  $\mu$ M; E10 – 10  $\mu$ M 2,4-D); wartości oznaczone tymi samymi literami, w obrębie tej samej kombinacji, nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .

W badaniach stwierdzono, że sacharoza jest preferowanym źródłem węgla w pożywce indukującej DSE w kulturze zarodków zygocycznych *Arabidopsis*. Sacharoza okazała się także najbardziej efektywnym źródłem węgla w stymulowaniu zarodków somatycznych kulturze embriogennej *Asparagus officinalis* (17) oraz *Cichorium ssp.* (18). Pozostałe badane cukry – glukoza, maltoza i fruktoza, których przydatność w indukcji somatycznej embriogenezy wykazano u innych roślin (19-21), jak się okazało, były nieprzydatne u *Arabidopsis*.

Częstotliwość konwersji zarodków somatycznych w rośliny wynosząca blisko 80%, przewyższała 2-krotnie oszacowaną dla zarodków *Arabidopsis* powstających z embriogenego kalusa (10). Pomimo że kwas giberelinowy jest częstym składnikiem pożywek stymulujących rozwój somatycznych zarodków w rośliny (22-24) związek ten nie podnosi efektywności konwersji zarodków somatycznych *Arabidopsis*.

Niewątpliwą zaletą proponowanego systemu regeneracji roślin *Arabidopsis* jest bardzo uproszczona sekwencja pożywek. Zarodki somatyczne powstawały i dojrzewały na pożywce indukcyjnej, w obecności 2,4-D, a konwertowały w rośliny po usunięciu tej auksyny z pożywki. Podobny, prosty system został opisany dla *Arachis hypogaea* (16). Najczęściej jednak spotykane w literaturze protokoły są wieloetapowe i uwzględniają sekwencję kilku różniących się składem pożywek (25,26).



Rys. 6. Częstotliwość konwersji zarodków somatycznych w pędy ogółem i pędy z korzeniami na pożywce MS20 oraz MSGA zawierającej kwas giberelinowy GA<sub>3</sub>; wartości oznaczone tymi samymi literami, w obrębie tej samej kombinacji, nie są istotnie różne dla  $P < 0,05$ .

Proponowany system regeneracji roślin *Arabidopsis* drogą DSE może być powszechnie stosowany w kulturach *in vitro* tego gatunku ponieważ charakteryzuje się:

- wysoką częstotliwością indukcji embriogenezy (ponad 80%),
- znaczną liczbą zarodków wytwarzanych przez eksplantat (ponad 17),
- krótkim cyklem kultury (ok. 3 tygodnie do uzyskania pierwszych roślin),
- sekwencją 2 pożywek o prostym składzie,
- możliwością stosowania u wielu genotypów (13).

## Literatura

1. Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M., (1998), *Science*, 282, 662-682.
2. Barakat A., Matassi G., Bernard G., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 10044-10049.
3. Bevan M., Murphy G., (1999), *Trends Genet.*, 15, 211-214.
4. Negrutiu I., Beeftink F., Jacobs M., (1975), *Plant Sci. Letters*, 5, 293-304.
5. Lloyd A., Barnason A. R., Rogers S. G., Byrne M. C., Fraley R. T., Horsch R. B., (1986), *Science*, 234, 464-466.
6. Schmidt R., Willmitzer L., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 583-586.
7. Akama K., Shiraishi H., Ohta S., Nakamura K., Okada K., Shimura Y., (1992), *Plant Cell Rep.*, 12, 7-11.
8. Sangwan R. S., Bourgeois Y., Dubois F., Sangwan-Norreeel B. S., (1992), *J. Plant Physiol.*, 140, 588-595.



9. Wu Y., Haberland G., Zhou C., Koop H-U., (1992), *Protoplasma*, 169, 89-96.
10. Luo Y., Koop H-S., (1997), *Planta*, 202, 387-396.
11. Mordhorst A. P., Voerman K. J., Hartog M. V., Meijer E. A., van Went J., Koornneef M., deVries S. C., (1998), *Genetics*, 149, 549-563.
12. Pillon E., Terzi M., Baldan B., Mariani P., Schiavo F. L., (1996), *The Plant J.*, 9, 573-577.
13. Gaj M. D., (2001), *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 39-46.
14. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Exp Cell Res.*, 50, 151-158.
15. Murashige T., Skoog F. A., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 437-497.
16. Hazra S., Sathaye S. S., Mascarenhas A. F., (1989), *Biotechnology*, 7, 949-951.
17. Levi A., Sink K. C., (1991), *Hort Science*, 26, 1322-1324.
18. Vesseur J., Dubois J., Hilbert J. L., Couillerot J. P., (1995), *Biotechnology for Agriculture and Forestry*, Ed. Bajaj Y. P S., 125-137, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
19. Kunitake H., Nakashima T., Mori K., Tanaka M., (1997), *J. Plant Physiol.*, 150, 458-461.
20. Pasternak T. P., Rudas V. A., Lörz H., Kumlehn J., (1999), *J. Plant Physiol.*, 155, 371-375.
21. Cunha A, Fernandes-Ferreira M., (1999), *J. Plant Physiol.*, 155, 591-597.
22. Garcia de E., Martinez S., (1995), *J. Plant Physiol.*, 145, 526-530.
23. Binzel M. L., Sankhla N., Joshi S., Sankhala D., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 536-540.
24. Kim Y. W., Youn Y., Noh E. R., Kim J. C., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 869-873.
25. Navarro C., Escobedo R. M., Mayo A., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 51, 17-25.
26. Jeong W. J., Sung R. M., Liu J. R., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 648-651.