

Kultury *in vitro* pszenicy — stan badań

Izabela Menke-Milczarek

Janusz Zimny

Zakład Kultur Tkankowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Radzików

1. Wstęp

O ogromnej roli roślin dla wyżywienia człowieka może świadczyć to, że stanowią one aż 93% jego diety, a w pozostałych 7% biorą w niej pośredni udział będąc składnikiem pasz zwierzęcych. Najważniejszą grupę roślin stanowią rośliny zbożowe. Osiem zbóż: pszenica, ryż, kukurydza, jęczmień, owies, żyto, sorgo i proso z rodziny Graminae (*Poaceae*) dostarcza 52% podawanych z pożywieniem kalorii (1). Spośród wymienionych rodzajów zbóż, pszenica zajmuje pierwsze miejsce zarówno pod względem powierzchni zasiewów, jak i produkcji. Ogromny przyrost naturalny zwłaszcza w krajach Afryki, Azji i Ameryki Łacińskiej zmusza do wysiłków mających na celu osiągnięcie jak największego wzrostu plonów roślin uprawnych.

Metodami, z którymi wiąże się nadzieje na przyspieszenie tempa hodowli są kultury tkankowe. Aby zastosowanie tych metod zostało uwieńczone sukcesem, muszą być spełnione dwa warunki: pierwszy to umiejętność regeneracji dojrzałych roślin z pojedynczych komórek, a drugi to trwałe umieszczenie, integracja i ekspresja obcego genu w genomie rośliny gospodarza.

Do początku lat osiemdziesiątych istniały tylko pojedyncze doniesienia o regeneracji roślin zbóż z kultur tkankowych. W wielu przypadkach regeneracja była sporadyczna i ograniczała się do kilku genotypów. Lata osiemdziesiąte przyniosły według Vasila (1) cztery znaczące odkrycia, które dały początek nowoczesnym badaniom w dziedzinie kultur tkankowych roślin zbożowych:

- określenie rodzaju używanego explantatu i jego fazy rozwojowej,
- zastosowanie prostej, syntetycznej pożywki wzbogaconej auksyną,
- uzyskanie długotrwałych kultur embriogenego kalusa, z którego regeneracja odbywa się poprzez tworzenie somatycznych zarodków,
- uzyskanie embriogennych zawiesin komórkowych, które pochodzą z embriogenego kalusa i stanowią źródło totipotentnych protoplastów, tzn. komórek pozbawionych ściany komórkowej.

Wprowadzenie do protoplastów obcego DNA przyczynia się do powstania roślin transgenicznych mających cechy kodowane przez sztucznie wprowa-

dzone geny. Obecnie transgeniczne zboża otrzymywane są poprzez wprowadzenie obcych genów do protoplastów za pomocą elektroporacji, lub traktowania glikolem polietylenowym (2). Inne sposoby wprowadzenia obcego DNA — to elektroporacja DNA do enzymatycznie lub mechanicznie zranionej zawiesiny komórkowej, kalusa, bądź zarodków (3-5), a także poprzez wstrzeliwanie genów (6-8). Dzięki wymienionym metodom uzyskano płodne rośliny transgeniczne noszące geny odporności na herbicydy (9-10), insekty (11-12), wirusy (13) i grzyby (14).

W latach dziewięćdziesiątych stopień zaawansowania prac prowadzonych z wykorzystaniem inżynierii genetycznej przedstawia się odmiennie dla poszczególnych rodzajów i gatunków roślin zbożowych.

2. Wpływ eksplantatu

Najtrudniejszym etapem w zapoczątkowaniu hodowli *in vitro* pszenicy było poszukiwanie właściwego eksplantatu. Pierwszymi badaczami, którzy podjęli próbę indukcji kalusa w tkance interkalarnej pszenicy byli Trione i wsp. (15). W 1969 r. Shimada i wsp. (16) otrzymali tkankę kalusową wykładając na pożywkę segment międzywęzła. W 1978 r. O'Hara i Street (17) zregenerowali pędy z kalusa uzyskanego z osadek kłosowych. Początek lat osiemdziesiątych przyniósł burzliwy rozwój kultur *in vitro* pszenicy. Okazało się, że bardzo dobrymi eksplantatami są tkanki o charakterze merystematycznym. Najczęściej wykładanymi eksplantatami pszenicy są obecnie niedojrzałe zarodki i młode kwiatostany. Stosunkowo łatwo można otrzymać kalus z podstawy liścia. Stwierdzono, że stadium rozwojowe eksplantatu jest czynnikiem krytycznym do otrzymania totipotentnej kultury. Tylko w bardzo krótkim przedziale czasowym w trakcie rozwoju zarodków, kwiatostanów i liści są one zdolne do tworzenia embriogennej kultury. W takim stadium rozwojowym pewne wyselekcjonowane komórki eksplantatu posiadają charakter merystematyczny, są tylko częściowo zróżnicowane i nie są zdolne do pełnienia żadnych wyspecjalizowanych funkcji. Eksplantaty wykładane na pożywkę w okresie przed lub po tym stadium rozwojowym tworzą nieembriogeny kalus. Dudis i wsp. (18) oraz Gosch-Wackerle i wsp. (19) opisali tworzenie się kalusa i regenerację z kwiatostanów pszenicy, znajdujących się w fazie podziałów mejotycznych sporocytów, natomiast Chin i Scott (20) z młodszych stadiów rozwojowych kwiatostanów. W dwóch pierwszych doniesieniach tylko osadki kłoskowe były stosowane do inicjacji kultury, natomiast w następnym kalus tworzył się głównie z młodszych plewek. Ozias-Akins i Vasil (21) wykładali młode kwiatostany 4-20 mm długości, otoczone liśćmi i pocięte na 2-4 mm segmenty. Największą zdolnością do indukowania somatycznej embriogenezy i regeneracji roślin charakteryzują się młode kwiatostany pszenicy o długości pomiędzy 5 a 10 mm (21-23). W przypadku niedojrzałych zarodków stadium rozwojowe również odgrywa niebagatelną rolę (24). Pszenica jest jednym z niewielu gatunków roślin zbożowych, który tworzy kalus z dwóch różnych części zarodka: tarczki (25,26) i epiblastu (27). Generalnie kalus

pochodzący z tarczki jest większy i tworzy więcej pędów niż kalus pochodzący z epiblastu (27). Trzecim często wykładanym eksplantatem są liście. Regenerację roślin z kalusa pochodzącego z liści pszenicy drogą organogenezy opisali Ahuja i wsp. (28), oraz Zamora i Scott (29). Natomiast o regeneracji drogą somatycznej embriogenezy donoszą Wernicke i Milkovits (30), oraz Rajyalakshmir i wsp. (31). W ostatniej cytowanej pracy autorzy stwierdzili, że także w przypadku liści stadium rozwojowe ma decydujące znaczenie. Większy procent kalusów, a także lepszą regenerację roślin uzyskiwali oni wykładając eksplantaty z drugiego i trzeciego liścia siewek. Tylko 10-12 mm odcinek podstawy liścia można wykorzystać do inicjacji kalusa, a regeneracja roślin jest możliwa tylko z kalusa pochodzącego z najniższego 5 mm odcinka.

Rośliny haploidalne i podwojone haploidy metodą *in vitro* uzyskuje się, gdy jako eksplantaty wykorzystane są pylniki i mikrospory (32-40). W tym przypadku również ważne jest stadium rozwojowe eksplantatu. Dla przeprowadzenia androgenyzy rośliny muszą być ścięte kiedy większość mikrospor znajduje się w środkowej lub późnej jednojądrowej fazie (36,39). Inną metodą otrzymywania haploidów pszenicy jest metoda krzyżowania pszenicy z kukurydzą (41). Pszenica zostaje zapylna pyłkiem kukurydzy, tworzą się haploidalne zarodki pszenicy, a chromosomy kukurydzy są eliminowane. Stosowana u jęczmienia technika krzyżowań z *Hordeum bulbosum* u większości odmian pszenicy nie daje pozytywnych rezultatów z powodu obecności genów Kr_1 i/lub Kr_2 , dlatego też godna polecenia jest metoda krzyżowań z kukurydzą.

3. Wpływ genotypu

Drugim bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na indukcję kalusa, a następnie na zdolność do regeneracji roślin jest genotyp (42-46). Przebadano szereg różnych genotypów pszenicy i stwierdzono, że ich zdolność do somatycznej embriogenezy jest różna i znajduje się pod genetyczną kontrolą. Mathias i Simpson (44) oszacowali relatywny wpływ jaki na hodowlę *in vitro* mają zmiany składników pożywek, a jaki genotyp. Autorzy ci sugerują, że wpływ genotypu na zachowanie się kultury jest bardziej istotny. Trwają badania nad zidentyfikowaniem genów, które odpowiadają za zachowanie się różnych genotypów w kulturach *in vitro*, a także nad ich lokalizacją w genomie. Mathias i Fukui (47) pokazali, że zastąpienie chromosomu 4B odmiany Chinese Spring chromosomem 4B z odmiany Cappelle-Desprez zwiększyło intensywność somatycznej embriogenezy. Zjawisko to nasunęło przypuszczenie, że czynnik lub czynniki, które stymulują wzrost, morfologię i regenerację kalusa pszenicy są zlokalizowane w chromosomie 4B. Zamiana tego chromosomu może modyfikować w komórkach metabolizm hormonalny i przez to następuje zmiana odpowiedzi *in vitro*. Następnie w celu dalszej analizy wpływu efektu chromosomalnego na regenerację kalusa pszenicy Higgins i Mathias (48) przebadali euploidalne linie Chinese Spring i Cappelle-Desprez, ditelocentryczną linię Chinese Spring ze względu na długie ramie

chromosomu 4B, kilka linii Chinese Spring, w których chromosom 4B został zastąpiony przez jego homologi z różnych odmian pszenicy. Kalusy pochodzące z tych linii różniły się wzrostem i aktywnością regeneracyjną. W 1988 r. Mathias i Atkinson (49) badając odmiany izogeniczne pod względem genów karłowatości/niewrażliwości na kwas giberelinowy — (Rht) geny i ich allele (rht), stwierdzili, że geny karłowatości mają znaczący wpływ na odpowiedź komórkową poprzez zmianę systemu receptorów w stosunku do egzogennych auksyn i kwasu giberylinowego, wzrost i morfogenezę kalusa. Okazało się, że prócz wpływu czynników fizjologicznych, na zdolność do regeneracji mają też wpływ czynniki środowiskowe. Galiba (50) badał odpowiedź *in vitro* zarodków pochodzących z odmiany Chinese Spring/Cheyenne substytucyjnych linii rosnących w warunkach kontrolowanych i w polu. Stwierdził, że chromosomy 7B,7D,1D, których aktywność manifestowała się w obu warunkach, mogą posiadać geny kontrolujące odpowiedź kultur tkankowych (TCR-tissue culture response). Wykorzystując aneuploidy i linie alloplazmatyczne w badaniach nad jądrową i cytoplazmatyczną kontrolą zdolności do kultury i regeneracji kalusa otrzymanego z tarczki zarodków pszenicy, Felsenburg i wsp. (51) donieśli o tym, że chromosom 2BS jest odpowiedzialny za różnicowanie się pędów, a 6BL okazał się istotny dla wzrostu kalusa. Kaleikau i wsp. (52) badali mieszańce pomiędzy monosomiczną odmianą Wichita i linią „ND732” charakteryzującą się silną regeneracją. Stwierdzili, że w szczególności chromosom 2D zawiera czynniki genetyczne promujące wzrost kalusa i regenerację. W dalszych badaniach autorzy ci (53) wskazują, że główny gen odpowiedzi kultur tkankowych jest zlokalizowany na 2DL, oraz iż 2AL i 2BS posiadają mniej znaczący gen TCR. Główny gen regulatorowy kontrolujący ekspresję TCR genów może być zlokalizowany na chromosomie 2BL. Badając dziedziczenie zdolności do somatycznej embriogenezy i regeneracji roślin de Buyser i wsp. (54) doszli do przekonania, że krótkotrwała i długotrwała hodowla znajduje się pod kontrolą odmiennych genów. Długotrwałe utrzymująca się zdolność pszenicy do somatycznej embriogenezy wymaga bardziej zawikanych mechanizmów niż krótkotrwała. Wobec licznych trudności z określeniem odpowiedzialności poszczególnych genów, autorzy ci sugerują, że aby zrozumieć w pełni zdolność do regeneracji w kulturach tkankowych trzeba wziąć pod uwagę to, iż może się ona znajdować pod kontrolą specyficznych jądrowo-cytoplazmatycznych interakcji. Henry i wsp. (55) poprzez badanie kultur niedojrzałych zarodków z linii aneuploidów doszli do lokalizacji na chromosomach genów kontrolujących krótkotrwałą i długotrwałą somatyczną embriogenezę u pszenicy. Stwierdzili, że kontrola somatycznej embriogenezy i regeneracji jest poligeniczna. Na somatyczną embriogenezę składa się szereg etapów, które pozostają pod kontrolą różnych genów. Indukowanie komórek tarczki do somatycznej embriogenezy podczas fazy, w której niezbędne są auksyny — według cytowanych autorów może znajdować się pod kontrolą czterech ramion chromosomów: 1AL, 3AL, 3BL i 3DL. Ich nieobecność redukuje tworzenie się zarodków somatycznych i ogranicza regenerację. Następny etap związany jest z różnicowaniem zaindukowanych komórek, które prowadzi do powstania zarodków lub zielonych centr. W trakcie

tego etapu jest zaangażowanych wiele genów. Jedynie ramiona 1DL i 1DS mają wyraźnie negatywny wpływ. Zdolności do regeneracji z krótkotrwałej kultury polegają głównie na formowaniu zarodków zdolnych do kiełkowania. Jest kilka ramion chromosomów 1AS, 2AL i 2BL, które tylko kontrolują kiełkowanie. Ich brak redukuje zdolności do regeneracji z krótkotrwałych i długotrwałych kultur. Dwa dalsze ramiona 6DS i 7BS także są związane z procesami regeneracji. Prawdopodobnie odpowiadają za jakość tworzących się zarodków. Brak 4BS, 5BS i 7DS polepsza częstotliwość regeneracji tylko po długotrwałej kulturze. 1BS i 2DS są potrzebne do utrzymania zdolności embriogennych i regeneracji roślin po czternastu miesiącach kultury. W przypadku kultur pylnikowych badano także genetyczny wpływ na tworzenie się kalusa, całkowitą regenerację roślin i regenerację roślin zielonych (56). Badania prowadzono na liniach substytucyjnych Chinese Spring/Cheyenne. Okazało się, że rozpatrywane trzy czynniki są poligenicznie determinowane, a ich dziedziczenie jest niezależne. Wszystkie te badania potwierdzają, że zdolność do regeneracji u roślin pszenicy jest zależna od genotypu.

4. Wpływ składników podłoża

Innym czynnikiem, który zrewolucjonizował hodowlę *in vitro* pszenicy i pozostałych roślin zbożowych było zastosowanie syntetycznej pożywki wzbogaconej auksyną. W literaturze dotyczącej indukowania somatycznej embriogenezy pszenicy można znaleźć dane o testowaniu całego szeregu pożywek: B5 (25), N6 (57), SMH (58), LS (59), KAO (46), PGO (60). Pożywki te różnią się między sobą składem makro- i mikroelementów, oraz ilością witamin, cukrów i dodatkiem różnych substancji organicznych. Najczęściej stosowaną przez badaczy pożywką jest MS (61), na bazie której czynione są różne modyfikacje dotyczące stężenia makroelementów (27,62), wpływu substancji organicznych, takich jak: hydrolizat kazeiny, L-tryptofan czy L-arginina (63). Okazuje się, że hydrolizat kazeiny i L-arginina nie mają żadnego wpływu na liczbę formowanych somatycznych zarodków, natomiast L-tryptofan w połączeniu z 2,4-D (kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy) sprzyja wzrostowi ich liczby, podczas gdy ten sam tryptofan w połączeniu z Dicambą powoduje spadek liczby zarodków. Ozias-Akins i Vasil (64) obserwowali tworzenie się typowych embrioidów na białym kalusie, którego ilość znacznie wzrastała kiedy podwajano stężenie makroelementów w oryginalnej pożywce MS. Carman i wsp. (63) potwierdzili to zjawisko, natomiast He i wsp. (27) nie zanotowali istotnych różnic. Badając wpływ stężeń poszczególnych makroelementów w pożywce MS na indukcję i morfologię embriogennego kalusa He i wsp. (62) stwierdzili, że do jego proliferacji niezbędnym czynnikiem jest NH_4NO_3 . Obecność CaCl_2 , MgSO_4 , KNO_3 i KH_2PO_4 nie jest niezbędna dla inicjacji i rozwoju kalusa powstającego z epiblastu, ale silnie wpływa na dalszy rozwój tego kalusa i jego proliferację. Wyższe stężenia KH_2PO_4 powodują wzrost rozwoju struktur liściowych. KNO_3 , CaCl_2 nie mają żadnego znaczenia w przypadku kalusa z tarczki, natomiast MgSO_4 tylko w niewiel-

kim stopniu. Brak w pożywce CaCl_2 objawia się błądnością kalusa, natomiast brak MgSO_4 powoduje, że kalus jest mniejszy i bardziej wodnisty. O ile makroelementy mają w różnym stopniu wpływ na inicjację kalusa pszenicy, to na wytworzenie prawidłowych somatycznych zarodków istotny wpływ ma rodzaj i stężenie dodawanej auksyny. Wiadomo, że fitohormony są związane ze wzrostem i rozwojem roślin, ale ich rola w embriogenezie i organogenezie w hodowlach tkankowych jest słabo poznana. Zapotrzebowanie na regulatory wzrostu jest odmienne dla różnych eksplantatów. Olbrzymia różnorodność pomiędzy genotypami w ich zdolności do somatycznej embriogenezy i regeneracji roślin, przez niektórych badaczy jest wiązana z różnicami w poziomie endogennych substancji wzrostowych (2,65). Nawet eksplantaty z tego samego genotypu nie dają identycznej odpowiedzi w kulturach (27). Powszechnie stosowanym regulatorem wzrostu w kulturach tkankowych pszenicy jest 2,4-D (27,63,66-68). Mechanizm działania tego związku w indukcji podziałów może polegać wg Yamady i wsp. (69) na tworzeniu kompleksów z białkami histonowymi bogatymi w lizynę. Wiele genotypów pszenicy produkuje kalus zdolny do regeneracji na pożywkach z 2,4-D (45). Tworzenie się pędów jest zwiększone jeśli taki kalus zostanie po pewnym czasie przeniesiony na pożywkę regenerującą zawierającą cytokininy (29,58,70,71). W wielu przypadkach spadek stężenia 2,4-D lub dodatek cytokinin stymulują proliferację pączków (18,66). Drugą auksyną stosowaną w kulturach pszenicy jest Dicamba (kwas 3,6-dwuchloro-2-metoksybenzoesowy) (57,58). W porównaniu z 2,4D Dicamba silniej wpływa na tworzenie się pędów, metabolizm tego związku polega na hydroksylacji węgla w pozycji 5 pierścienia, a następnie połączeniu z glukozą. Rośliny regenerowane z kalusów indukowanych na pożywkach zawierających Dicambę są słabsze. Można to zjawisko wytłumaczyć tym, że szybki metabolizm Dicamby sprzyja przedwczesnemu dojrzewaniu somatycznych zarodków, które są fizjologicznie mniej dojrzałe i w efekcie dają słabsze rośliny (58). W przypadku stosowania Dicamby w pożywce indukującej, kiedy głównym celem jest szybka regeneracja roślin, można skrócić jej czas o 2-3 tygodnie w porównaniu z 2,4D. Oprócz 2,4D i Dicamby stosowane były w kulturach tkankowych pszenicy również inne auksyny: IAA i NAA (25,68,72), bądź kombinacje auksyn i cytokinin. Dicamba w połączeniu z kinetyną (6-furfuryloaminopuryną) powoduje zwiększenie zdolności do regeneracji kalusa *Triticum aestivum* L. (58). Połączenie 2,4D z kinetyną również może wpływać stymulująco na regenerację roślin. Fekete i Pauk (71) stosowali dwustopniowy system regeneracji roślin. W pierwszym etapie do indukcji embriogenego kalusa używali pożywki z kombinacją 2,4D (1-1,5 mg/l) i kinetyny (0,5-4 mg/l), a w następnym etapie embriogeny kalus przenosili na pożywkę z 4 mg kinetyny, uzyskując w ten sposób najlepsze rezultaty. Znaczny wzrost ilości tworzących się pędów można uzyskać przenosząc kalus z pożywki indukującej na regeneracyjną zawierającą cytokininy (70). Rola cytokinin w regeneracji roślin zbóż nie jest dość jasna. W wielu przypadkach dodatek cytokinin do pożywki indukującej stymuluje pączkowanie, oraz jak podaje Yurkova i wsp. (68) niskie stężenia cytokinin stymulują tworzenie się korzeni. Zwiększenie stężenia cytokinin powoduje, że

ilość korzeni w kulturze maleje. Bardzo wysokie stężenia rzędu 10-20 mg/l powodują nekrozę kalusa (68). Hamujący wpływ kinetyny na proliferację kalusa został zauważony również przez Lazara i wsp. (42). Te sprzeczne ze sobą doniesienia odnośnie do zapotrzebowania na cytokininy w trakcie regeneracji roślin w kulturach tkankowych pszenicy mogą być tłumaczone tym, że testowane genotypy, miały różny poziom endogennych cytokinin.

W przypadku niektórych jednoliściennych na inicjację embriogennych kultur w znaczący sposób wpływa również poziom kwasu abscysynowego. Brown i wsp. (73) podają, że niskie stężenia ABA stymulują embriogenezę w kulturach pszenicy, a Carman (74) uważa, że dodanie kwasu abscysynowego do pożywki indukującej powoduje zwiększenie ilości niedojrzałych zarodków tworzących kalus z tarczki, prawdopodobnie poprzez zahamowanie zjawiska przedwczesnego dojrzewania, oraz zmniejsza ilość embrioidów z widocznymi nieprawidłowościami. Z badań Qureshi i wsp. (75) natomiast wynika, że należy uwzględnić stopień rozwoju zarodka wykładanego na pożywkę. Wzrost stężenia ABA w pożywce hamuje dojrzewanie zarodków będących w późniejszej fazie rozwojowej 21-25 dni po kwitnieniu, jednakże podatność na działanie kwasu abscysynowego jest różna. Kiedy ABA jest dodawany do pożywki z wyłożonymi zarodkami wcześniejszej fazy rozwojowej 10-14 dni po kwitnieniu, ich zdolność do produkowania embriogennego kalusa spada. Dzieje się to być może dlatego, że zarodki w tej fazie posiadają za duży poziom endogennego ABA i dodawanie go z zewnątrz jest zbędne.

W kulturach pylnikowych pszenicy stosuje się pożywki różniące się nieco składem od pożywek, na które wykładane są niedojrzałe zarodki, kwiatostany czy liście. Dodatkowym elementem w tych pożywkach jest, np. wyciąg z ziemniaków — potato 2 medium (76), dodatek 0,5 mg/l glutaminy i zestalenie gerlitem (77). Znaczny postęp w kulturach pylnikowych został osiągnięty przez zastosowanie w pożywce płynnej ficolu (78) i maltozy (79). Last i Brettel (80) podają, że zastąpienie w kulturach pylnikowych pszenicy sacharozy przez maltozę spowodowało 3-4-krotny wzrost liczby zarodków, podczas gdy dwa inne cukry: glukoza i fruktoza zmniejszały znacznie ich liczbę.

5. Powstawanie i charakterystyka różnych typów kalusa

Następnym ważnym etapem w rozwoju kultur tkankowych pszenicy była umiejętność prowadzenia długotrwałych hodowli kalusa, z którego regenerację roślin uzyskuje się poprzez somatyczne zarodki. W obecności odpowiednio dobranego stężenia auksyny eksplantat uzyskuje, lub są mu nadane, embriogenne zdolności poprzez pobudzenie kilku komórek w specyficznych miejscach. Obserwacja ultrastruktury tych komórek sugeruje, że występuje w nich intensywna synteza RNA i aktywizacja procesów metabolicznych. Embriogenne komórki są małe, przeciętnie o średnicy 31 μm (59), o cienkich ścianach komórkowych, bazofilne, bogate w cytoplazmę, zawierające małe wakuole i ziarna skrobi. W przypadku zbyt niskiego poziomu 2,4D w podłożu, embriogenne komórki wydłużają się przyjmując kształt tuby, przeciętna ich śred-

nica zwiększa się do 51 μm , a długość wzrasta do 355 μm (59). Rozwijają się w nich duże wakuole, komórki tracą swój bazofilny charakter, ich ściany grubieją, a ziarna skrobi zanikają. Ten proces prowadzi do tworzenia się nieembriogenego kalusa, z którego można uzyskać tylko korzenie. Jednakże przy zachowaniu odpowiedniego poziomu auksyny w podłożu, w sferach merystematycznych dzielącej się tkanki w sposób ciągły zachodzą podziały embriogennych komórek. W przypadku niedojrzałych zarodków pszenicy między 2 a 4 dniem kultury następuje gwałtowna proliferacja kalusa i pojawiają się wyraźnie widoczne centra merystematyczne wylaniające się z tarczki. Po sześciu do ośmiu dni rozwijania kultury powstaje zbity żółtawy kalus o gładkiej powierzchni. Wzrost tego kalusa przez pierwszych 16 dni jest możliwy głównie dzięki podziałom komórek na jego powierzchni i w warstwach przypowierzchniowych. Zarówno powierzchnia kalusa jak i wewnętrzne, merystematyczne strefy barwią się intensywnie na obecność RNA, komórki zawierają niewielkie ilości skrobi lub jej nie zawierają. Zewnętrznie kalus ma wygląd gruzełkowy, jest to efektem nierównomiernego rozmieszczenia stref aktywności merystematycznej (64). Zdaniem badaczy większość kultur stanowi mieszaninę kalusa kruchego, luźnego nieco wodnistej w wyglądzie, słabo uorganizowanego nie mającego właściwości embriogennych i kalusa embriogenego o bardziej zbitej, zorganizowanej strukturze. W zorganizowanych regionach kalusa tworzą się zarodki i zarodkopodobne struktury. Niektóre niedojrzałe zarodki pszenicy produkują dwa rodzaje kalusa embriogenego: gładki z osi pędu i gruzełkowy z tarczki (59). Regeneracyjne zdolności kalusa są utrzymywane poprzez ciągłe selekcjonowanie i subkulturę jego zbitych, uorganizowanych fragmentów. Kalus taki wykazuje mniejsze przyrosty niż kalus nieembriogeny. De Buyser i wsp. (81) podają, że można otrzymać rośliny po 3,5-letniej kulturze *in vitro*, ale wtedy zwiększa się częstotliwość występowania mutacji chromosomowych. Redway i wsp. (82) opisują tworzenie się z zarodków i kwiatostanów na pożywce indukującej dwóch typów embriogenego kalusa pszenicy: jednego kremowego, zbitego, gruzełkowego, uorganizowanego i drugiego białego, zbitego. Chociaż zarodki somatyczne są lepiej widoczne na białym, zbitym kalusie niż na typie kremowym, to pierwszy rodzaj kalusa był trudniejszy do subkultury, brązował i przestawał rosnać na pożywce utrzymującej. Natomiast kalus kremowy, po przeniesieniu go na pożywkę utrzymująca stawał się mniej zorganizowany i tworzył więcej, miękkiego, nieembriogenego kalusa. Po pięciu miesiącach subkultury tego kalusa otrzymał on nazwę „starego”. Powierzchniowo i mikroskopowo był on podobny do wcześniej tworzącego się jednomiesięcznego, kremowego kalusa. Dalsze pasażowanie „starego” kalusa prowadziło do tworzenia się kruchego kalusa złożonego z małych, okrągłych, gęstych cytoplazmatycznie komórek, wśród których obserwowano duże, wydłużone i mocno zwakuolizowane, nieembriogenne komórki. Kruchy kalus rósł znacznie szybciej niż kalus zbity. Po każdorazowej subkulturze prawie dwukrotnie powiększał on swoją objętość. Kalus ten zachowywał swoje embriogenne zdolności przez ponad 19 miesięcy, a po przeniesieniu na pożywkę regeneracyjną dawał pędy. Ten typ kalusa najlepiej nadaje się do zakładania embriogennych zawieszin komórkowych (82).

W przypadku pszenicy często obserwuje się zjawisko przedwczesnego dojrzewania somatycznych zarodków, które jest czynnikiem mogącym ograniczać uzyskiwanie długotrwałych kultur o morfogenicznym potencjale. Pierwszymi, którzy opisali występowanie tego zjawiska w kulturach *in vitro* pszenicy byli Ozias-Akins i Vasil (21). Przedwczesne dojrzewanie to według wymienionych autorów tworzenie się pędu zanim zarodek uzyska strukturalną i fizjologiczną dojrzałość. Powstają zarodkopodobne struktury, które nie są typowymi zarodkami, gdyż brak im tarczki i nie mają normalnego koleoptyla. Zjawisko to jest niepożądane, ponieważ somatyczne zarodki nie mogą się namnożyć i zapoczątkować wtórnej embriogennej tkanki (67). Wydaje się, że zjawisko przedwczesnego dojrzewania zarodka może być częściowo zahamowane przez zwiększenie stężenia 2,4D w pożywce (63,64,67), dodatek kwasu abscysynowego lub zmianę osmomolarności przez dodanie różnych stężeń cukrów. Bapat i wsp. (67) stwierdzili również, że przedwczesne dojrzewanie zarodków jest wyraźnie zależne od genotypu.

6. Zawiesiny komórkowe i kalus jako źródło protoplastów

Bardzo istotnym kierunkiem badań jest dążenie do uzyskania roślin z protoplastów zbóż. U roślin dwuliściennych izolację protoplastów można uzyskać z miększu liściowego, natomiast w przypadku jednoliściennych tylko u ryżu otrzymano dzielące się protoplasty z miększu i zregenerowano z nich rośliny (83). Jediną drogą do uzyskania protoplastów pszenicy było jak dotąd, założenie zawiesiny komórkowej. Użycie szybko rosnącej embriogennej zawiesiny zapewnia wiele korzyści, takich jak: szybki przyrost, łatwość izolacji protoplastów i wysoki potencjał podziałowy. Z drugiej strony jednak uzyskanie tego typu zawiesiny komórkowej jest długotrwałym procesem, a większość roślin pochodzących z takiej kultury jest sterylna (84). Innym mankamentem używania zawiesin komórkowych do uzyskiwania totipotentnych protoplastów jest to, że z upływem czasu zawiesiny komórkowe tracą swe embriogenne właściwości. Dotychczas zawiesiny komórkowe pszenicy otrzymywano z kultur pylnikowych (85), młodych kwiatostanów (86,87), lub niedojrzałych zarodków (84,88-91). Istnieją dwie metody zakładania zawiesin komórkowych pszenicy: w pierwszej wykorzystuje się specjalny typ kalusa o luźnej, gruzelkowatej strukturze otrzymany w wyniku długotrwałej selekcji tego kalusa na stałym podłożu (82,88,92), oraz druga w której świeży, nieselekcjonowany kalus jest przenoszony do podłoża płynnego, a zawiesina pochodzi z grup komórek hodowanych w tym podłożu (93,94). Idealna zawiesina komórkowa zawiera tylko delikatnie zdyspersowane grupy komórek, bez większych kawałków kalusa (95). Jednakże w przypadku pszenicy jest wiele doniesień na temat tendencji do tworzenia się dużych agregatów komórkowych (89,92,94, 96,97). Większość autorów uważa je za zbędne i pozbywa się ich metodą filtracji kultur (89,92). Yang i Scott (98) stwierdzili, że jakkolwiek najlepsze rezultaty w izolacji i kulturze protoplastów uzyskuje się gdy zawiesina składa się z agregatów poniżej 310 μm , to jednak wielkie agregaty komórkowe po-

wyżej 1100 μm uwalniają w zawieszynie mniejsze skupiska komórek i wówczas jest możliwe wykorzystywanie tych większych agregatów do zakładania embriogennych zawiesin. Protoplasty izolowane z różnej wielkości skupisk komórek mają podobne zdolności do podziałów i regeneracji roślin.

W przypadku pszenicy dość dużo czasu zajęło uzyskanie ustabilizowanej zawiesiny, z której możliwe było otrzymywanie protoplastów, a w końcowym efekcie płodnych roślin. Pierwsze próby w tym kierunku podjęli u pszenicy Potrykus i Petruska (99) zakończyły się one niepowodzeniem, gdyż nie uzyskano podziału protoplastów. Maddock i wsp. (100) uzyskali podział protoplastów z dwóch szybko rosnących zawiesin, ale nie udało im się zregenerować roślin. W badaniach Harris i wsp. (88) źródłem protoplastów była zawiesina komórkowa pochodząca z kalusa pylników, jednakże uzyskane podziały protoplastów i częstotliwość regeneracji była niska. Wang i wsp. (91) otrzymali małe rośliny regenerowane z protoplastów. Nie podali jednak czy te rośliny osiągnęły dojrzałość. W 1990 r. jednocześnie Redway i wsp. (101) i Vasil i wsp. (84) donieśli o założeniu embriogennej zawiesiny komórkowej, która stała się źródłem totipotentnych protoplastów i udało im się zregenerowane z protoplastów rośliny przenieść do warunków glebowych. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o uzyskaniu roślin z protoplastów pochodzących z zawiesin komórkowych. Chociaż istnieją obecnie możliwości zamrażania zawiesin (102), aby nie tracić ich embriogennych zdolności, to jednak proces zakładania i ustalania zawiesiny komórkowej jest nadal bardzo czasochłonny i wymagający sporych nakładów pracy.

Obecnie badacze pracują nad uzyskaniem totipotentnych protoplastów z embriogennego kalusa pszenicy. Po raz pierwszy o uzyskaniu protoplastów z kalusa donieśli Hayashi i Shimamoto (103), ale uzyskali z nich tylko rośliny albinotyczne. Ren i wsp. (87), a następnie Guo i wsp. (104) otrzymali rośliny z protoplastów pochodzących z długotrwałej hodowli kalusa. W 1994 r. Zaghmout (105) izolował protoplasty z embriogennego kalusa pszenicy odmiany Chinese Spring, przeciętnie 68% izolowanych protoplastów dzieliło się, a 22% formowało kolonie. Autor uzyskał podziały i tworzenie się kalusa zarówno z protoplastów pochodzących z transformowanych jak i nietransformowanych tkanek. He i wsp. (97) otrzymali protoplasty z pierwotnego kalusa pszenicy odmiany Hartog, ale podziały tych protoplastów zachodziły z niską częstotliwością. Autorzy sugerują, że stan rozproszenia embriogennych komórek jest najważniejszym czynnikiem w skutecznej indukcji regeneracji roślin z protoplastów pszenicy, a informacje o stopniu stanu rozproszenia tych komórek mogą pozwolić na przezwyciężenie trudności związanych z kulturą protoplastów z pierwotnego kalusa. Pierwotny kalus stanowi znacznie dogodniejszy materiał wyjściowy niż embriogenna zawiesina komórkowa, tym bardziej, że jak podaje Vasil i wsp. (84) w przypadku zawiesiny istnieje prawdopodobieństwo występowania niestabilności chromosomowych.

7. Techniki transformacji pszenicy

W ciągu ostatnich dziesięciu lat opracowano kilka metod transformowania roślin. Jedną z nich, najbardziej powszechną, jest metoda z użyciem *Agrobacterium tumefaciens*. Przez wiele lat przyjmowano, że rośliny jednoliścienne są niewrażliwe na działanie *Agrobacterium*, ponieważ nie są one jego naturalnymi gospodarzami. Ostatnio pojawiło się kilka doniesień o przeniesieniu T-DNA z *Agrobacterium* do komórek roślin jednoliściennych takich jak kukurydza, ryż i pszenica (106-109). Trwale stransformowany kalus pszenicy został uzyskany przy użyciu *Agrobacterium* przez Mooney i wsp. (109). Być może dalsze badania pozwolą ustalić jakie czynniki determinują powinowactwo roślin jednoliściennych w stosunku do *Agrobacterium*. Obecnie jednak większość badaczy stara się rozwijać alternatywne metody transformacji. Bezpośredniego przeniesienia DNA do protoplastów można dokonać metodą: elektroporacji oraz z użyciem glikolu polietylenowego (PEG). Jednakże w obu przypadkach konieczne jest dysponowanie totipotennymi protoplastami, a także dobrze opracowanym systemem regeneracji z tkanki kalusowej. O zastosowaniu elektroporacji jako efektywnej metody do transformowania protoplastów uzyskanych z długotrwałej kultury kalusa *Triticum aestivum* L. donoszą Zaghmout i Trolinden (110). Zhou i wsp. (111) również transformowali protoplasty izolowane z zawiesiny komórkowej otrzymanej z kalusa pochodzącego z pylników. Protoplasty te były transformowane metodą elektroporacji z wykorzystaniem plazmidów pBARGUS lub pBAS, które niosły gen *bar* — odporności na herbicyd Basta. W metodzie elektroporacji tkanki, etap uzyskiwania protoplastów może być całkowicie pominięty (112). Transgeniczne rośliny kukurydzy otrzymywano tą metodą z niedojrzałych zarodków i embriogennego kalusa (3). U pszenicy Klöti i wsp. (113) dokonali metodą elektroporacji transferu genów do niedojrzałych zarodków. Użyto plazmidu pBC17, o którym wiadomo, że stymuluje produkcję antocjanu w pszenicy. Poprzez obserwację kumulacji antocjanu w wakuolach komórek ustalano, które komórki uległy transformacji. Okazało się, że elektroporacja jest tkankowo specyficzna, a najbardziej wrażliwymi ze wszystkich komórek zarodka są komórki tarczki. Dla zwiększenia liczby stransformowanych komórek ważna jest również orientacja osi zarodka w komorze elektroporacyjnej. Zarodki ustawiano tarczką w kierunku elektrody ujemnej ponieważ ujemnie naładowane cząsteczki plazmidowego DNA poruszały się w kierunku elektrody dodatniej. W elektroporacji przepuszczalność membran i ścian komórkowych dla DNA jest zwiększona przez impuls elektryczny. Natomiast w innej stosowanej obecnie metodzie — wstrzeliwaniu genów — poruszające się z dużą prędkością pociski są używane do przenoszenia DNA poprzez ściany komórkowe i membrany do wnętrza komórek roślinnych. W 1991 r. Vasil i wsp. (114) jako pierwsi otrzymali trwale stransformowane linie kalusa, uzyskane metodą wstrzelania genów do zawiesiny komórkowej, z których jednak nie udało się autorom zregenerować roślin. W 1992 r. Vasil i wsp. (10) otrzymali szereg linii stransformowanego kalusa, tym razem bombardując przy użyciu strzelby genowej specyficzny, embriogenny kalus, powstały w wyniku długo-

trwałej hodowli *in vitro*. Z jednej z tych linii udało się zregenerować stransformowane rośliny, które jednak były niezdolne do samozapylenia. Płodne potomstwo tych roślin zostało otrzymane poprzez krzyżowanie z innymi liniami i przenosiło stransformowane cechy do pokolenia T₂. Weeks i wsp. (115) spróbowali za pomocą wstrzeliwania genów stransformować kalus produkowany przez niedojrzałe zarodki po krótkim czasie kultury. Uzyskali 9 niezależnych linii, płodnych, stransformowanych roślin, opornych na herbicyd Basta. Becker i wsp. (116) otrzymali stransformowane rośliny, gdy jako celu dla pocisków opłaszczonych plazmidem pDB1 używali tarczki niedojrzałych zarodków pszenicy. Dzięki zastosowaniu, jako metody przenoszenia DNA, strzelby genowej stało się możliwe wykorzystanie takich eksplantatów jak merystem wierzchołkowy lub młody kwiatostan. Niestety, jak dotąd, nie mają one zastosowania w przypadku pszenicy.

8. Zmienność somaklonalna

Zmienność somaklonalna jest wywoływana przez stres indukowany warunkami hodowli *in vitro*, a także przez procesy transformacji (112). Częstotliwość występowania pojedynczej lub większej liczby mutacji jest prawdopodobnie dość wysoka. Hashim i wsp. (117) przeprowadzili porównanie niektórych cech morfologicznych między regenerantami otrzymanymi z kalusa indukowanego z niedojrzałych zarodków pszenicy, a ich potomstwem i formami rodzicielskimi służącymi jako kontrola. Generalnie zmienność między potomstwem regenerantów była mniejsza niż między porównywanymi regenerantami. Badano takie cechy jak: długość i szerokość liścia flagowego, wysokość roślin, długość kłosa, liczbę kłosek, liczbę ziarniaków w kłosie, długość ości. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w cechach morfologicznych między pierwotnymi regenerantami a ich rodzicami. Z kilkoma zaledwie wyjątkami regeneranty były krótsze, bardziej rozkrzewione i miały mniejsze liście flagowe. Dwa regeneranty otrzymane z podłoża wzbogaconego auksyną Dicambą miały dwa kłosa na jednej lodydze. Obserwowano również zmiany dotyczące koloru i wielkości ziarniaków Larkin i wsp. (118) badali zmienność somaklonalną dotyczącą cech morfologicznych i biochemicznych regenerantów uzyskanych po kulturze *in vitro* niedojrzałych zarodków pszenicy. Zmienność została zaobserwowana w przypadku cech znajdujących się pod prostą kontrolą genetyczną takich jak, np. kolor ziarna, i bardziej złożoną — jak w przypadku wysokości rośliny. Modyfikacje na poziomie mitochondrialnego DNA u roślin pszenicy zregenerowanych po krótko- i długotrwałej somatycznej embriogenezie zostały stwierdzone przez Hartmana i wsp. (119). Symillides i wsp. (120) natomiast przebadali somaklony uzyskane po jednej do sześciu subkultur, pod względem trzynastu rolniczo i morfologicznie ważnych cech, w porównaniu do form rodzicielskich. Statystycznie istotna zmienność była obserwowana tylko w przypadku wysokości roślin, długości kłosa i głównej średnicy węzła krzewienia pomiędzy somaklonami regenerowanymi z długotrwałej kultury i ich rodzicami. Obserwowane różnice między somaklonami

zwiększały się w zależności od czasu trwania kultury, prowadząc do znaczących modyfikacji w strukturze roślin. Jednakże szereg zmian ujawniających się podczas kultur tkankowych ma dużo mniejsze znaczenie niż opisywano to we wcześniejszej literaturze. Zdaniem niektórych autorów zmienność somaklonalna może być wykorzystana jako źródło roślin o nowych ważnych z hodowlanego punktu widzenia cechach. Jak dotąd nie ma publikacji dotyczących częstotliwości mutacji powstających w następstwie elektroporacji lub wstrzeliwania genów. Jest wysoce prawdopodobne, że otrzymane transgeniczne rośliny oprócz pożądanego genu zawierają liczne, inne mutacje, które mogą mieć wpływ na ich fenotyp. De Block (112) sugeruje aby wprowadzać pożądane geny raczej na wcześniejszym etapie cyklu hodowlanego.

9. Zakończenie

Opanowanie technik indukowania somatycznej embriogenezy, a następnie regeneracji roślin pszenicy stanowi punkt wyjścia do dalszych badań związanych z transformacją roślin. O ile uzyskiwanie kalusa z niedojrzałych zarodków, a następnie regeneracja z niego roślin stała się w chwili obecnej zjawiskiem powszechnym, to szybka metoda otrzymywania totipotentnych protoplastów i regeneracja z nich roślin znajduje się ciągle jeszcze w sferze badań. Chociaż zainteresowanie systemem regeneracji z wykorzystaniem protoplastów, ze względu na możliwość zastosowania strzelby genowej nieco się zmniejszyła, to jednak protoplasty stwarzają okazję do manipulowania pojedynczymi komórkami oraz fuzjonowania ich z protoplastami innych gatunków i w ten sposób pokonywania bariery niekrzyżowalności. Oczekuje się, że dzięki zastosowaniu kultur tkankowych uzyskiwanie nowych odmian, będzie zajmowało znacznie mniej czasu niż w przypadku tradycyjnych metod hodowli. W chwili obecnej udoskonalenie metod regeneracji płodnych roślin z kultur komórkowych, w połączeniu z zastosowaniem nowych metod przekazywania DNA i selekcji transformowanych komórek, zaowocowało otrzymaniem transgenicznych roślin w przypadku wszystkich głównych gatunków zbóż. Jednak w przypadku pszenicy żadna z metod uzyskania roślin transgenicznych nie jest jeszcze metodą rutynową, która byłaby stosowana z powodzeniem we wszystkich laboratoriach i dla wszystkich genotypów.

Literatura

1. Vasil I. K., (1995), *Cellular and molecular genetic improvement of cereals*, in: Eds. M. Terzi et al., *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 5-18.
2. Bhaskaran S., Smith R. H., (1990), *Crop Sci.*, 30, 1328-1336.
3. D'Halluin K., Bonne E., Bossut M., de Beuckeleer M., Leemans J., (1992), *Plant Cell*, 1495-1505.
4. Laurusen C. M., Krzyzek R. A., Flick C. E., Anderson P. C., Spencer T. M., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 24, 51-61.

5. Xu X., Li B., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 237-242.
6. Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1994), *The Plant Journal*, 5 (2), 299-307.
7. Vasil V., Srivastava V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K., (1992), *Bio/Technology*, 11, 1553-1558.
8. Zimny J., Becker D., Brettschneider R.B., Lörz H., (1995), *Molecular Breeding*, 1, 155-164.
9. Fromm M. E., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J., Klein T. M., (1990), *Bio/Technology*, 8, 833-839.
10. Vasil V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K., (1992), *Bio/Technology*, 10, 667-674.
11. Fujimoto H., Stoh K., Yamamoto M., Kyojuka I., Shimamoto K., (1993), *Bio/Technology*, 11, 1151-1155.
12. Koziel M. G., Beland G. L., Browman C., Carozzi N. B., Crenshaw R., Grossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPherson K., Meghji M. R., Merlin E., Rhodes R., Warren G. W., Wright M., Evola S. V., (1993), *Bio/Technology*, 11, 194-200.
13. Murry L. E., Elliott L. G., Capitant S. A., West J. A., Hanson K. K., Scarafia L., Johnston S., de Luca-Flaherty C., Nichols S., Cunanan D., Dietrich P. S., Mettler I. J., Dewald S., Warinick D. A., Rhodes C., Sinibaldi R. M., Brunke K. J., (1993), *Bio/Technology*, 11, 559-564.
14. Uchimiya H., Iwata M., Nojiri C., Sanarajeewa P. K., Takamatsu S., Ooba S., Anzai H., Christensen A. H., Quail P. H., (1993), *Bio/Technology*, 11, 835-836.
15. Trione E. J., Jones L. E., Metzger L., (1968), *Am. J. Bot.*, 55, 529-531.
16. Shimada T., Sasakura T., Tsunewaki T., (1969), *Can. J. Genet. Cytol.*, 11, 294-304.
17. O'Hara J. F., Street H. E., (1978), *Ann. Bot.*, London, 42, 1029-1038.
18. Dudits D., Nemet G., Haydu Z., (1975), *Can. J. Bot.*, 53, 957-963.
19. Gosch-Wackerle G., Avivil L., Calune E., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, 91, 267-278.
20. Chin J. C., Scott K. J., (1977), *Ann. Bot.*, 41, 473-481.
21. Ozias-Akins P., Vasil I. K., (1982), *Protoplasma*, 110, 95-105.
22. Menke-Milczarek I., Zimny J., (1992), *Biull. of Polish Academy of Sci. Biological Sci.*, 40, 3, 184-188.
23. Marcińska I., Dubert J.F., Biesaga-Kościelniak J., (1995), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 41, 285-288.
24. He D. G., Tanner G., Scott K. J., (1986), *Plant Sci.*, 45, 119-124.
25. Chawla H. S., Wenzel G., (1987), *Arch. Zuchtungs-forsch.*, Berlin 17, 6, 337-343.
26. Quereshi J. A., Karha K. K., Abrams S. R., Steinhauer L., (1989), *Plant Cell and Organ Culture*, 18, 55-69.
27. He D. G., Yang Y. M., Scott K. J., (1988), *Plant Science*, 57, 225-233.
28. Ahuja P. S., Pental D., Cooking E. C., (1982), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 89, 139-144.
29. Zamora A. B., Scott K. J., (1983), *Plant Sci. Lett.*, 29, 183-189.
30. Wernicke W., Milkovits L., (1984), *J. Plant Physiol.*, 115, 49-58.
31. Rajyalakshmir K., Grover A., Maheshwan N., Tyagi A. K., Maheshwan S. C., (1991), *Physiologia Plantarum*, 82, 617-623.
32. Gustafson V. D., Baenziger P. S., Wright M. S., Stroup W. W., Yen Y., (1995), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42, 207-213.
33. Henry J., de Buyser J., Guenegon T., Ory C., (1984), *Theor Appl Genet.*, 67, 439-442.
34. Hu H., Xi Z., Jing J., Wang X., (1981), *Cell and Tissue Culture Technique for Improvement of Cereal Crops*, Beijing, China, 767-778.
35. Lazar M. D., Baezinger P. S., Schaeffer G. W., (1984), *Theor Appl Genet.*, 68, 131-134.
36. Lazar M. D., Schaeffer G. W., Baenziger P. S., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 103-109.
37. Liang G. H., Sangduen N., Heyne E. G., Sears R. G. (1982), *J. Hered.*, 73, 360-364.
38. Marsolais A. A., Seguin-Swartz G., Kasha K. J., (1984), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3, 69-79.
39. Mejza S. J., Morgan V., di Bona D. E., Wong J. R., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 149-153.
40. Szakacs E., Barnabas E., (1995), *Euphytica*, 83, 209-213.
41. Suenaga K., Nakajima K., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 263-266.
42. Lazar M. D., Collins G. B., Vian W. E., (1983), *J. Heredity*, 74, 353-357.

43. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J. (1983), *J. Exp. Bot.*, 34, 915-926.
44. Mathias R., Simpson E. S., (1986), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7, 31-37.
45. Sears R. G., Deckard E. L., (1982), *Crop Science*, 22, 546-550.
46. Menke-Milczarek I., Zimny J., (1992), *Biull. of Polish Academy of Sci. Biological Sci.*, 40, 3, 189-195.
47. Mathias R. J., Fukui K., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 70-75.
48. Higgins P., Mathias R. J., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 439-444.
49. Mathias R. J., Atkinson E., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 75, 474-479.
50. Galiba G., Kovacs G., Sutka J., (1986), *Plant Breed.*, 97, 261-263.
51. Felsenburg T., Feldman M., Galuv E., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 802-810.
52. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989 a), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 625-632.
53. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989 b), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783-787.
54. de Buyser J., Marcotte J-L., Henry Y., (1992), *Euphytica*, 63, 265-270.
55. Henry Y., Marcotte J-L., de Buyser J., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 344- 350.
56. Szakacs E., Kovacs G., Pauk J., Barnabas B., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 127-129.
57. Husinger H., Schauz K., (1987), *Plant Breeding*, 98, 119-123.
58. Papenfuss J. M., Carman J. G., (1987), *Crop Sci.*, 27, 588-593.
59. Heyser J.W., Nabors M. W., Mac Kinnon C., Dykis T. A., Demott K. J., Kautzman D. C., Mujeeb-Kazi A., (1985), *Z. Pflanzenzuchtg.*, 94, 218-223.
60. Zhang L. J., Seilleur P., (1987), *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 22, (3), 187-197.
61. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
62. He D. G., Yang Y. M., Scott K. J., (1989), *Plant Science*, 64, 251-258.
63. Carman J. G., Jefferson N. E., Campbell W. F., (1987), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 10, 101-113.
64. Ozias-Akins P., Vasil I. K., (1983), *Protoplasma*, 117, 40-44.
65. Norstog K., (1970), *Dev. Biol.*, 23, 665-670.
66. Ahoowalia B. S., (1982), *Crop. Sci.*, 22, 405-410.
67. Bapat S. A., Joshi C. P., Mascarenhas A. F., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 538-541.
68. Yurkova G. N., Levenko B. A., Novozhilov O. V., (1981), *Bioch. Physiol. Pflanzen.*, 176, 236-243.
69. Yamada Y., (1977), *Tissue culture studies on cereals*, in: Eds. Reinert J. Bajaj Y. P. S., *Plant cell tissue and organ culture*, Springer-Verlag, Berlin, 144-158.
70. Breiman A., Flesenburg T., Galum E., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 73, 827-831.
71. Fekete S., Pauk J., (1989), *Cereal Research Communication*, 17, 3-4, 237-244.
72. Ball S., Zhou H. P., Konzek C. F., (1993), *Plant Sci.*, 90, 195-200.
73. Brown C., Brooks F. J., Pearson D., Mathias R. J., (1989), *J. Plant Physiol.*, 133, 727-733.
74. Carman J. G., (1988), *Planta*, 175, 417-424.
75. Qureshi J. A., Karha K. K., Abrams S. R., Steinhauer L, (1989), *Plant Cell and Organ Culture*, 18, 55-69.
76. Chuang C. C., Onyang T. W., Chia H., Chou S. M., Chin C. K., (1978), in: *Proc. Sym. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, 51-56.
77. Henry Y., de Buyser J., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 77-79.
78. Zhou H., Konzak C. F., (1989), *Crop Sci.*, 29, 817-821.
79. Fadel F., Wenzel G., (1990), *Plant Breeding*, 105, 278-282.
80. Last D. I., Brettell R. I. S., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 14-16.
81. de Buyser H. Y., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 77-79.
82. Redway F. A., Vasil V., Lu D., Vasil I. K., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 609-617.
83. Gupta M., Pattanayak S., (1993), *Plant Cell Report.*, 8, 590-593.
84. Vasil V., Redway F., Vasil I. K., (1990), *Bio/Technology*, 8, 429-433.
85. Harris R., Wright M., Byrne M., Varnum J., Brightwell B., Schubert K. J., (1988), *Plant Cell Report.*, 7, 337-340.
86. Pauk Z., Kertes Z., Jeness B., Purnhauser L., Manien O., Pulli S., Barabas Z., Dudits D., (1994), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38, 1-10.
87. Ren J. G., Jia J. F., Li M. Y., Zhen G. G., (1989), *Sci Sin. B*, 9, 693-695.
88. Li Z. Y., Xia G. M., Chen H. M., Guo G. Q., (1992), *J. Plant Physiol.*, 139, 714-718.

89. Qiao Y. M., Cattano M., Locatelli F., Lupotto F., (1992), *Plant Cell Rep.*, 8, 716-717.
90. Pauk Z., Kertesz Z., Jeness B., Purnhauser L., Manien O., Pauli S., Barabas Z., Dudis D., (1994), *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 38, 1-10.
91. Wang H. B., Li X. H., Sun B. L., Fang R., Wang P., Chen J., Zhu Z., Zhang L. M., Zhang W., Wei J. K., Lan J. S., Sun Y. R., (1988), *Newsletter*, 4, 2, 11-16.
92. Wang H. B., Li X. H., Sun Y. R., Chen J., Zhu Z., Fang R., Wang P., Wei J. Q., (1990), *Scientia Sinica B*, 33, 294-302.
93. Wang W. C., Nguyen H. T., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 639-642.
94. Yang Y. M., He D. G., Scott J. K., (1991), *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 445-452.
95. Vasil I. K., (1987), *J. Plant Physiol.*, 128, 193-218.
96. Chang Y. F., Wang W. C., Warfield C. Y., Nguyen, H. T., Wong J. R., (1991), *Plant Cell Rep.*, 9, 611-614.
97. He D. G., Yang Y. M., Scott K. J., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 16-19.
98. Yang Y. M., He D. G., Scott K. J., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 176-179.
99. Potrykus I., Petruska J., (1983), *Approaches to cereal protoplast culture: morphogenic cultures in wheat*, in: Ed. Potrykus I., *Proc. of 6th International Protoplast Symp.*, Birkhauser Verlag, 12-14.
100. Maddock S. E., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 23-26.
101. Redway F. A., Vasil V., Vasil I. K., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 714-717.
102. Gnanapragasm S., Vasil I. K., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 419-423.
103. Hayashi Y., Shimamoto K., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 414-417.
104. Guo G. Q., Xia G. M., Li Z., Chenb H. M., (1991), *Scientia Sinica B*, 34, 438-444.
105. Zaghmout O, M-F., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 577-582.
106. Boulton M. J., Buchholz W. G., Marks M. S., Markham P. G., Davis J. W., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12, 31-35.
107. Rashid H., Yokoi S., Toriyama K., Hinata K., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 727-730.
108. Conner A. J., Dommissie E. M., (1992), *Int. J. Plant Sci.*, 153 (4), 550-555.
109. Mooney P. A., Goodwin P. B., Dennis E. S., Llewellyn D. J., (1991), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 25, 209-218.
110. Zaghmout O, M-F., Trolinden N. L., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 721-730.
111. Zhou H., Stiff C. M., Konzak C. F., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 612-616.
112. de Block M., (1993), *Euphytica*, 71, 1-14.
113. Klöti A., Iglesias V.A., Wunn J., Burkhardt P. K., Datta S. K., Potrykus I., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 671-675.
114. Vasil V., Brown S. M., Re D., Fromm M. E., Vasil I. K., (1991), *Bio/Technology*, 9, 743-747.
115. Weeks J. T., Anderson O. D., Blechl A. E., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 1077-1084.
116. Becker D., Brettschneider R., Lorz H., (1994), *The Plant Journal*, 5 (2) 299-307.
117. Hashim Z. N., Campbell W. F., Carman J. G., (1990), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 95-99.
118. Larkin P. J., Ryan S. A., Brettel P. J. S., Scowcroft W. R., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 67, 443-455.
119. Hartman C. Y., de Buyser H. J., Aubry C., Rode A., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 169-175.
120. Symillides Y., Henry Y., de Buyser J., (1995), *Euphytica*, 82, 263-268.

Wheat tissue culture — a review

Summary

Based on the available literature, this article describes the advances made in cell culture of wheat. The importance of the age and physiological stage of the explant is discussed. The influence of the genotype is observed. The role of the components of the induction medium and in particular the role of auxin and kinetin, is investigated. The development of off-white callus and

long-term culture of this callus facilitates the establishment of suspension culture — a source of totipotent protoplasts. This paper also focuses on the techniques which are used to introduce genes into wheat plants and on the somaclonal variation that occurs in a population of plants regenerated after tissue culture.

Key words:

wheat, tissue culture, somatic embryogenesis, cell suspension, protoplast, transformation.

Adres do korespondencji:

Izabela Menke-Milczarek, Zakład Kultur Tkankowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, 05-870 Błonie, fax 725-47-14;
i.milczarek@ihar.edu.pl, j.zimny@ihar.edu.pl