

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 3 - NR 3**

**1976 (161-286)**

**Postępy  
Biologii  
Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik  
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydawany z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,  
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,  
01-813 Warszawa

---

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu 1976

Wydanie I. Nakład 416 + 104 egz. Ark. wyd. 11. Ark. druk. 7<sup>2</sup>/<sub>8</sub> + wkl. Papier druk. sat. III kl.  
80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w kwietniu 1976. Podpisano do druku w lipcu 1976.  
Druk ukończono w sierpniu 1976. Zam. 223/76 — L-12. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

## NOWE KIERUNKI W HODOWLI TKANEK I KOMÓREK ROŚLINNYCH IN VITRO

Ewa BARTKOWIAK

Instytut Genetyki i Hodowli Roślin SGGW w Warszawie

*Streszczenie.* Artykuł obejmuje zestawienie dotychczasowych osiągnięć w zakresie hodowli haploidów i protoplastów roślinnych. Omawiane są również możliwości wykorzystania metod in vitro w badaniach teoretycznych, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień genetycznych.

### WSTĘP

Obecny stan wiedzy na temat molekularnych podstaw działania genu i mechanizmów ekspresji genetycznej opiera się w głównej mierze na analizie tych zagadnień u mikroorganizmów. Stanowią one systemy, w których zależność między genem a cechą jest stosunkowo prosta i ze względu na poziom haploidalny łatwa do uchwycenia. Możliwość tworzenia przejściowego stanu diploidalnego pozwala na badanie zjawisk komplementacji i rekombinacji, a krótki cykl życiowy ułatwia otrzymywanie dużych populacji w warunkach laboratoryjnych.

U organizmów wyższych, a więc również roślin, możliwość zastosowania metod biologii molekularnej do analizy genetycznej jest w dużym stopniu ograniczona, przede wszystkim ze względu na kompleksowość procesów rozmnażania i rozwoju, długi cykl życiowy oraz poziom diploidalny uniemożliwiający bezpośrednią ekspresję wszystkich genów. Badanie zjawisk rekombinacji wewnątrzgenowej czy wykrycie określonych mutacji biochemicznych wymaga olbrzymiej liczebności potomstwa i zastosowania odpowiednio czułych metod w ściśle kontrolowanych warunkach, co w przypadku populacji roślinnych jest trudne do zrealizowania.

Jakkolwiek można się spodziewać, że mechanizmy podstawowych zjawisk genetycznych u organizmów wyższych i mikroorganizmów są

podobne, przeprowadzenie między nimi analogii nawet na poziomie komórkowym nie jest możliwe. Decyduje o tym, z jednej strony, odrębność strukturalna i funkcjonalna komórek pro- i eukariotycznych, z drugiej strony, całkowicie różny poziom organizacji, co oznacza, że pewne procesy będą w ogóle nieporównywalne. Przede wszystkim w obrębie organizmu komórki nie funkcjonują niezależnie od siebie, każda z nich jest częścią składową jednostki wyższego rzędu jaką jest tkanka czy organ. Określona sekwencja bodźców egzo- i endogennych wyzwała odpowiednie reakcje, indukując rozwój w takim a nie innym kierunku. Informacja genetyczna zawarta w organizmie nie jest przez cały czas i we wszystkich komórkach jednakowo wykorzystywana, w kolejnych etapach ontogenezy funkcjonują tylko niektóre geny. Ekspresja genów na poziomie komórkowym będzie więc uzależniona od nadrzędnej kontroli, podporządkowana zintegrowanej regulacji wewnątrz organizmu. Ciekawe byłoby zatem poznanie mechanizmów ekspresji genetycznej i charakteru egzo- i endogennych bodźców związanych z kontrolą aktywności genów w procesach różnicowania i rozwoju.

Możliwość eksperymentalnego badania tych zagadnień stwarza hodowla izolowanych komórek roślinnych w warunkach sztucznych. Bodźcem rozwoju metod hodowli *in vitro* stała się hipoteza totipotencji komórek. Zakłada ona, że skoro wszystkie komórki organizmu mają taki sam skład genetyczny, każda z nich, podobnie jak zygota, powinna być potencjalnie zdolna do wytworzenia całego skomplikowanego organizmu. W ostatnich latach uzyskano pełne potwierdzenie totipotencji komórek roślinnych i to zarówno diploidalnych, jak i haploidalnych [161, 182, 284, 381, 411]. Okazało się, że nawet wysoko wyspecjalizowane komórki w warunkach *in vitro* nabierają charakteru merystematycznego i zdolne są do odtworzenia całego procesu rozwojowego. Odróżnicowanie komórek następuje oczywiście w ściśle określonych warunkach. Jednym z podstawowych jest odizolowanie komórek od endogennego wpływu tkanek czy organów, w których się znajdowały. Drugim warunkiem jest dostarczenie im odpowiednich czynników i bodźców, podobnych do tych, jakie kierują rozwojem *in vivo*. Izolowane komórki nie podlegają wprawdzie endogennym ograniczeniom, mają natomiast szereg egzogennych wymagań. Zatem do odtworzenia procesów rozwojowych konieczne są dodatkowe bodźce uruchamiające ich metabolizm. Istotne są nie tylko odpowiednie kombinacje różnych bodźców (składniki pożywki, równowaga hormonalna, światło i jego intensywność, długość dnia, temperatura itd.), ale również ich określona sekwencja. Dopiero wtedy możliwe jest przeprowadzenie *in vitro* pełnej sekwencji rozwojowej od komórki do organizmu. Możliwość przekształcania pojedynczych komórek w organizm w aspekcie genetycznym oznaczałaby, że zablokowana w wysoce

wyspecjalizowanych komórkach informacja może być *in vitro* uruchomiona, a odróżnicowanie komórek musi być związane z derepresją nie-transkrybowanych genów. Istnieją zatem metody badania czynników ograniczających ekspresję genetyczną komórek roślinnych *in vivo* i zmian molekularnych w procesach odróżnicowania. Hodowla komórek poza organizmem i bez jego wpływu pozwala jednocześnie na zgłębienie biochemicznych i fizjologicznych podstaw indukcji różnicowania i rozwoju. Niezależnie od tego hodowla izolowanych komórek roślinnych *in vitro* stwarza możliwości bezpośredniego przeniesienia metod analizy genetycznej opracowanych dla mikroorganizmów czy zwierzęcych komórek somatycznych.

W artykule przedstawiono podstawowe metody i kierunki badań na kilku systemach eksperymentalnych (komórki haploidalne, diploidalne i protoplasty) oraz perspektywy ich wykorzystania w badaniach teoretycznych. Zastosowania praktyczne będą tematem odrębnego artykułu.

## I. OTRZYMYWANIE HAPLOIDÓW

Hodując na pożywkach wyizolowane w odpowiednim stadium pylniki [388, 390] udało się otrzymać u szeregu gatunków rośliny haploidalne. Metoda ta polega na wywołaniu dość nietypowego rozwoju mikrospor. W warunkach *in vivo* mikrospory rozwijają się w ziarna pyłku, natomiast *in vitro* mogą przekształcić się w wielokomórkowe zarodki lub tworzyć kalus. Następuje więc nie tylko zahamowanie normalnego rozwoju, ale i zmiana jego kierunku z gametofitycznego na sporofityczny. Zarodki przechodzą kolejne etapy porównywalne do normalnej embriogenezy (stadia: globularne, sercowate, torpedowate, liścieniowe), natomiast kalus można pobudzić do różnicowania i tą drogą doprowadzić do powstania roślin haploidalnych pochodzenia androgennego.

W tabeli 1 zestawiono dotychczasowe próby indukcji rozwoju haploidalnego i ich rezultaty. Pełną regenerację mikrospor w rośliny udało się uzyskać u 50 gatunków. U pozostałych osiągnięto jedynie pewne etapy rozwoju, począwszy od inicjacji podziałów w mikrosporach, poprzez nieorganizowany lub zdolny do różnicowania kalus, aż do haploidalnych siewek. U *Nicotiana*, gdzie możliwe jest uzyskanie odpowiednio dużych populacji roślin haploidalnych, przeprowadza się badania przydatności metod i otrzymanych haploidów do prac genetycznych. Obserwacje te dotyczą stabilności genetycznej haploidów, ekspresji różnych genów na poziomie di- i haploidalnym [48, 70, 72, 74, 266, 269, 270, 297, 418] oraz segregacji genów w potomstwie otrzymanych tą drogą form homozygotycznych i ich porównania z potomstwem pocho-

TABELA 1. Indukcja androgenozy w hodowli pylników in vitro

Lp.	Gatunek	Pożywka podstawowa	Droga indukcji		Wynik			Literatura
			Pyłek	Kalus	Zarodki lub kalus	Różn. kalusa lub siewki	Rośliny	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>Aegilops caudatus</i> ×	W		+			+	221, 222
2	<i>Aegilops umbellulatus</i>	LS, MS	+		+			451
3	<i>Agropyron repens</i>	B		+			+	146
4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LS, MS		+			+	101, 318
5	<i>Asparagus officinalis</i>	LS, MS, N	+				+	272, 344, 447
6	<i>Atropa belladonna</i>	N		+				5
7	<i>Beta vulgaris</i>	MS, N	+	+			+	163
8	<i>Brassica campestris</i>	N		+			+	203, 204
9	<i>Brassica oleracea</i> ×	N		+			+	203, 204
10	<i>Brrassica alboglabra</i>							
11	<i>Brassica napus</i>	LS	+					405
12	<i>Bromus inermis</i>	LS, MS	+		+		+	451
13	<i>Camellia sinensis</i>	N, B		+	+			198
14	<i>Capsicum annuum</i>	MS, W		+			+	134, 229, 298, 383, 425
15	<i>Capsicum frutescens</i>	MS, W, LS, N		+				298
16	<i>Coffea arabica</i>	LS		+				370
17	<i>Corchorus olitorius</i>	N, B		+				198
18	<i>Datura innoxia</i>	N	+	+			+	133, 152, 153, 154, 293, 380
19	<i>Datura metel</i>	N	+	+			+	60, 271, 293
20	<i>Datura meteloides</i>	N	+	+			+	133, 226, 293
21	<i>Datura muricata</i>	N	+	+			+	293
22	<i>Datura stramonium</i>	N	+	+			+	154
23	<i>Datura wrightii</i>	N	+	+			+	226

TABELA 1. — cd.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
23	<i>Digitalis purpurea</i>	MS, N, W		+			+	82
24	<i>Festuca pratensis</i>	LS, N	+		+			450
25	<i>Festuca arundinea</i> × <i>Lolium multiflorum</i>	MS, W		+			+	294
26	<i>Fragaria ananassa</i>	LS		+			+	281
27	<i>Helleborus foetidus</i>	LS, MS	+		+			451
28	<i>Hordeum vulgare</i>	LS, W	+	+	+	+	+	62, 63, 151, 241, 404, 450
29	<i>Hyoscyamus albus</i>	N	+				+	337
30	<i>Hyoscyamus niger</i>	N	+	+			+	81, 337
31	<i>Hyoscyamus pusillus</i>	N	+				+	337
32	<i>Lillium</i> sp.	LS		+		+		369
33	<i>Lolium multiflorum</i>	LS, W		+	+	+		62
34	<i>Lycium halmifolium</i>	LS	+		+	+		448
35	<i>Lycopersicum esculentum</i>	B, GE		+		+		147
36	<i>Lycopersicum peruvianum</i>	B, GE		+		+		147
37	<i>Lycopersicum pimpinell. Vifolium</i>	B, GE		+				147
38	<i>Malus domestica</i>	MS	+		+			227
39	<i>Nicotiana affinis</i>	N	+				+	287
40	<i>Nicotiana alata</i>	N	+				+	286, 293
41	<i>Nicotiana attenuata</i>	N	+					75
42	<i>Nicotiana clevelandii</i>	N	+				+	417
43	<i>Nicotiana glauca</i> × <i>Nicotiana langsdorffii</i>	N	+		+		+	377
44	<i>Nicotiana glutinosa</i>	N	+				+	286, 293
45	<i>Nicotiana knightiana</i>	N	+			+		75
46	<i>Nicotiana otophora</i>	MS	+				+	72
47	<i>Nicotiana raimondii</i>	N	+			+		75
48	<i>Nicotiana rustica</i>	N	+				+	286, 287, 293
49	<i>Nicotiana sanderae</i>	N	+				+	417
50	<i>Nicotiana suaveolens</i>	N	+			+	+	377

TABELA 1. — cd.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
51	<i>Nicotiana suaveolens</i> ×	N		+	+			157
	<i>Nicotiana langsdorffii</i>							
52	<i>Nicotiana sylvestris</i>	N	+				+	285, 287, 293
53	<i>Nicotiana tabacum</i>	N	+				+	36, 267, 268, 279, 293, 387
54	<i>Oryza sativa</i>	MS, B	+	+			+	273, 274, 280, 384, 426
55	<i>Paeonia hybrida</i>		+		+			392
56	<i>Paeonia lutea</i>	LS, MS	+		+			451
57	<i>Paeonia suffruticosa</i>	LS, MS	+		+			451
58	<i>Pelargonium hortorum</i>	W		+			+	1, 2
59	<i>Petunia axillaris</i>	N, MS	+	+		+	+	112, 394
60	<i>Petunia hybrida</i>	N, MS	+	+		+	+	379, 419
61	<i>Petunia hybrida</i> ×	N, Ms	+			+		343
	<i>Petunia axillaris</i>							
62	<i>Pharbitis nil</i>	N		+		+		361
63	<i>Prunus armeniaca</i>	MS		+	+			168
64	<i>Prunus avium</i>	LS, MS, N	+	+	+			201, 451
65	<i>Saintpaulia ionantha</i>	B, MS		+			+	192
66	<i>Secale cereale</i>	B, MS, N	+	+	+		+	242, 382, 406, 430
67	<i>Secale montanum</i>	LS	+	+	+			450
68	<i>Setaria italica</i>			+			+	12
69	<i>Solanum bulbocastanum</i>	MS	+				+	197
70	<i>Solanum cardiophyllum</i>	MS	+	+	+		+	197
71	<i>Solanum demissum</i>	N	+				+	197
72	<i>Solanum demissum</i> ×	MS	+	+	+			197
	<i>Solanum tuberosum</i>							
73	<i>Solanum dulcamara</i>	LS	+			+		449
74	<i>Solanum fendleri</i>	N	+				+	197
75	<i>Solanum hjertingii</i>	N	+			+	+	197
76	<i>Solanum houghasii</i>	N	+		+			197
77	<i>Solanum infundibuliforme</i>	MS	+		+			197



TABELA 1. — cd.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
78	<i>Solanum megistacrobolobum</i>	MS	+		+			197
79	<i>Solanum melongena</i>	N		+			+	198, 338
80	<i>Solanum michoacanum</i>	MS	+		+			197
81	<i>Solanum multidissectum</i>	MS	+	+	+			197
82	<i>Solanum nigrum</i>	MS		+			+	166, 167, 197
83	<i>Solanum penelli</i>	MS	+		+			197
84	<i>Solanum phureja</i>	MS	+				+	197
85	<i>Solanum phureja</i> ×	MS	+		+			197
	<i>Solanum tuberosum</i>							
86	<i>Solanum polytrichon</i>	N	+	+			+	197
87	<i>Solanum stenotomum</i>	MS	+				+	197
88	<i>Solanum stoloniferum</i>	N	+				+	197
89	<i>Solanum tuberosum</i>	MS	+				+	106, 197
90	<i>Solanum verrucosum</i>	W, MS, N	+	+			+	196, 197
91	<i>Solanum verrucosum</i> ×	MS	+				+	197
	<i>Solanum chacoense</i>							
92	<i>Solanum verrucosum</i> ×	MS					+	197
	<i>Solanum tuberosum</i>							
93	<i>Triticale</i>	MS				+		384, 385, 425
94	<i>Triticum aestivum</i>	MS		+			+	308, 320, 321, 424
95	<i>Triticum vulgare</i>	MS		+			+	61, 312
96	<i>Vitis vinifera</i>	B, GE		+	+			148

Objaśnienia:

- B — Blaydes (1966)  
 GE — Gamburg i Eveleigh (1966)  
 LS — Linsmeier i Skoog (1965)  
 MS — Murashige i Skoog (1962)  
 N — Bourgin i Nitsch (1967)  
 W — White (1963)

dzącym z krzyżowania linii czystych, uzyskanych za pomocą metod konwencjonalnych. Wyniki tych badań wskazują, że androgenne rośliny zachowują się jak normalne, otrzymywane przez krzyżowanie i selekcję formy, mają więc perspektywy dalszego wykorzystania.

Mimo że u wielu gatunków udało się osiągnąć przynajmniej pierwsze etapy androgenezy, hodowla haploidów *in vitro* napotyka szereg trudności. Indukcja kalusa pyłkowego jest zjawiskiem częstym, ale w wielu przypadkach jego rozwój po pewnym czasie zostaje zahamowany, czy też ma on ograniczone zdolności organogenezy. U szeregu gatunków próby indukcji rozwoju haploidalnego nie dały żadnych wyników. Jednym z problemów jest również powstawanie roślin o różnym poziomie ploidalności. Ponadto duży procent haploidów szczególnie u roślin jednoliściennych stanowią formy albinotyczne. Dlatego też prowadzi się szczegółowe badania dotyczące czynników odgrywających rolę w indukcji, jej mechanizmów i możliwości udoskonalenia metod warunkujących efektywniejszą indukcję.

#### 1. CZYNNIKI INDUKCJI ROZWOJU HAPLOIDALNEGO

a. Skład chemiczny pożywki. Z tabeli 1 wynika, że wybór podstawowych pożywek dla pylników jest dość ograniczony. Są to pożywki normalnie stosowane w hodowli tkanek roślinnych [31, 36, 152, 237, 262, 267, 432] czy też opracowane na ich podstawie dla haploidów. Dla poszczególnych gatunków stosuje się jednak różne modyfikacje lub kombinacje tych pożywek, a optymalne stężenia i proporcje różnych składników dobiera się na ogół indywidualnie. Substancje nieorganiczne nie odgrywają zasadniczej roli, ale np. dosyć istotne jest źródło żelaza, szczególnie w przypadku bezpośredniej embriogenezy mikrospor. Niedobór żelaza hamuje bowiem rozwój zarodków [290] na etapie stadium globularnego. Żelazo podaje się nie w postaci soli nieorganicznych, ale chelatów. Zwykle są to sole kwasu etyleno-dwuaminotetraoctowego (EDTA), stwierdzono jednak, że u niektórych gatunków częstość zarodków znacznie wzrasta [344, 378, 380] po zastosowaniu soli kwasu etyleno-dwuamino-di-O-oksyfenyloctowego (EDDOA) czy kwasu etyleno-dwuamino-di-O-hydroxyfenyloctowego (EDDHA). Dobranie składników organicznych i ich koncentracji jest trudniejsze, ponieważ mogą one spełniać kilka funkcji jednocześnie. Dość istotną rolę odgrywa stężenie sacharozy. Najistotniejsze jest jednak ustalenie równowagi hormonalnej (wzajemny stosunek auksyn i cytokinin) ze względu na wzajemne interakcje między tymi substancjami. Odpowiednie stężenia różnych typów regulatorów wzrostu mogą wpływać na rozwój w określonym kierunku. Często stosuje się naturalne ekstrakty bogate w składniki hormonalne

(wyciągi z bielma, mleko kokosowe itd.). Ich skład jest jednak niezbyt ściśle określony, co utrudnia kontrolę procesów indukcji, dlatego stosuje się je raczej tylko w przypadkach, kiedy syntetyczne regulatory wzrostu nie dają pożądanych wyników. Najkorzystniejsze byłoby stosowanie całkowicie syntetycznych pożywek, ponieważ daje to możliwość precyzyjnego operowania poszczególnymi składnikami.

W badaniach wstępnych dla danego gatunku stosuje się pożywki o prostym i ubogim składzie, zapewniające zachowanie żywotności mikrospor. Dopiero w następnych etapach wprowadza się wzbogacone stopniowo pożywki, warunkujące inicjację podziałów w mikrosporach. Po otrzymaniu kalusa lub zarodków następuje zmiana pożywek w celu dalszego różnicowania. Ich skład jest również odmienny dla poszczególnych gatunków, ale ustala się go na podobnych zasadach.

b. Temperatura i światło. Warunki w jakich prowadzi się hodowlę odgrywają również pewną rolę, a wymagania zmieniają się w zależności od obiektu. Zakres stosowanych temperatur waha się 23–28°C, najczęściej stosowana temperatura wynosi około 25°C. Temperatura wpływa ponadto na długość okresu między wyszczepieniem pylników a otrzymaniem siewek. Światło jest u niektórych gatunków bardziej, u innych mniej istotne [80, 121, 198, 216]. Pierwsze etapy hodowli przeprowadza się na ogół w ciemności, później stosuje się światło o różnym natężeniu. Po zainicjowaniu podziałów mikrospor korzystne dla dalszego różnicowania jest stosowanie zmiennych cykli światła i ciemności o różnej dla poszczególnych gatunków długości. W zależności od warunków światła i temperatury mogą zmieniać się wymagania wzrostowe, a od składu pożywki może zależeć reakcja tkanek na warunki hodowli.

c. Stadium rozwojowe mikrospor w momencie wyszczepienia pylników na pożywkę. Dla większości gatunków za optymalne uważa się stadium jednojądrowych mikrospor. Określenie to nie jest jednak zbyt precyzyjne, ponieważ stadium to trwa stosunkowo długo. Ponadto po rozpadzie tetrad nie ma już w pylniku ścisłej synchronizacji i poszczególne mikrospory mogą znajdować się na różnych etapach cyklu komórkowego, stąd też reakcja ich na warunki androgenezy może być niejednakowa. Dla pewnych gatunków, takich jak *Vitis* [148] i *Digitalis* [82] optymalne dla indukcji jest stadium tetrad. Z kolei u *Lycopersicum* [147] kalus wytwarzał się w pylnikach wyszczepionych w stadium mejozy. Przypadki te nie podważają jednak ogólnej reguły, ponieważ u *Lycopersicum* mejoza kończyła się w warunkach in vitro, natomiast u pozostałych gatunków nie podano, czy kalus tworzył się w obrębie tetrad, czy też po ich rozpadzie, z mikrospor.

Najściślej ustalono optymalne stadium indukcji dla *Nicotiana* [388]

i *Datura* [296]. Jest to faza tuż przed lub po pierwszej mitozie mikrospor i zbiega się ona z niską zawartością metabolitów i wysoką aktywnością jądra. Wskazują na to również dane, że ziarna zawierające skrobie nie dzielą się i nie biorą udziału w procesach androgenezy [20, 286, 344]. Zdaniem niektórych autorów wybór odpowiedniego stadium rozwoju mikrospor jest w indukcji decydujący. Świadczą o tym obserwacje, że w pylnikach zawierających pyłek w optymalnym stadium zarodki mogą rozwijać się na różnych typach pożywek czy też pożywkach o bardzo prostym składzie [319]. Stadium rozwojowe mikrospor wpływa również w pewnym stopniu na poziom ploidalności roślin otrzymywanych przez bezpośrednią embriogenezę.

d. Warunki wewnątrz pylnika. Różna reakcja pylników na te same warunki oraz fakt, że tylko niektóre mikrospory w obrębie pylnika podlegają procesom odróżnicowania wskazuje, że czynniki indukcji mogą mieć również charakter endogenny. Zagadnienia te zostaną poruszone w innych częściach artykułu.

e. Wiek, stadium rozwojowe oraz stan fizjologiczny roślin, z których pobiera się pylniki. Efektywność indukcji jest najwyższa, jeżeli hodzi się pylniki roślin znajdujących się w początkowych okresach kwitnienia lub w pełni kwitnienia. W późniejszych etapach pyłek ma mniejszą żywotność i ograniczone zdolności w kierunku androgenezy. Ponadto pod koniec okresu kwitnienia zwiększa się częstość nieprawidłowych podziałów w tkance sporogennej pylnika [73], co może mieć bezpośredni związek z powstawaniem niehaploidalnych roślin.

f. Droga indukcji. Jak już wspomniano w hodowli pylników *in vitro* istnieją dwa typy indukcji rozwoju haploidalnego: w wyniku przekształcania się mikrospor w zarodki lub też z kalusa wytwarzanego przez mikrospory.

Z genetycznego punktu widzenia bardziej pożądana byłaby bezpośrednia embriogeneza mikrospor. Otrzymane w ten sposób haploidy miałyby określony skład genetyczny, byłyby więc bardziej przydatne do badań. W przypadku powstawania roślin z kalusa podłoże genetyczne jest trudniejsze do ustalenia. W związku z niestabilnością cytologiczną komórek kalusa mogą powstawać rośliny o różnym poziomie ploidalności czy nawet chimery. Ponadto rozrost kalusa wewnątrz pylników utrudnia rozwój i izolowanie skupisk komórek oraz ich obserwację. Zachodzi również niebezpieczeństwo rozwoju kalusa z tkanek somatycznych i mieszania się komórek różnego pochodzenia.

Wydaje się jednak, że typ indukcji zależy od warunków hodowli. Na stabilność cytologiczną komórek kalusa wpływa szereg czynników [14]. W kalusie zdolnym do różnicowania, odchylenia od prawidłowego prze-

biegu podziałów są rzadsze. Istotny więc byłby czas hodowli oraz przenoszenie kalusa na świeże pożywki [276, 277, 426], ponieważ z wiekiem hodowli obniżają się zdolności morfogenetyczne. To samo dotyczyłoby możliwie wczesnego izolowania zarodków [346]. Ponadto typ indukcji może być do pewnego stopnia regulowany składem pożywki. Na przykład u niektórych gatunków [346] wysoki poziom potasu powoduje odchylenia od haploidalnej liczby chromosomów, a niektóre chelaty [344, 378] ograniczają rozwój kalusa. Wiadomo również, że częstość nieprawidłowych podziałów komórek *in vitro* zależy od typu regulatorów wzrostu i ich stężenia. Ponadto w wielu przypadkach indukcji za pośrednictwem kalusa, pierwsze etapy podziałów mikrospor [62, 155, 430] przebiegają w sposób podobny jak w przypadku bezpośredniej embriogenezy. Pewne obserwacje wskazują, że dopiero na pewnym etapie rozwoju mikrospor następuje przekształcanie się wytworzonych komórek w kalus. Z kolei u *Nicotiana*, gdzie bezpośrednia embriogeneza ziaren pyłku jest regułą, obserwuje się niekiedy recesję na kalus [106, 389], którą można usunąć wycofaniem niektórych substancji wzrostowych z pożywki. Indukcja w kierunku kalusa czy embriogenezy może zatem być kwestią odpowiedniej równowagi hormonalnej między egzo- i endogennymi regulatorami wzrostu w pierwszych stadiach rozwoju i istnieją pewne możliwości indukcji w pożądanym kierunku drogą dodawania lub usuwania różnych substancji z pożywki na określonych etapach hodowli.

W związku z intensywnym rozrostem kalusa, również z tkanek somatycznych, powstał problem ograniczenia jego rozwoju. Natomiast wobec braku stabilności cytologicznej komórek kalusa zachodzi konieczność opracowania metod utrzymania jego haploidalności. W tym celu stosuje się parafluorofenyloalaninę (PFP) używaną do haploidyacji grzybów; u roślin analog ten powoduje somatyczną redukcję liczby chromosomów [295]. Mechanizm działania PFP mimo szeregu badań nie został wyjaśniony [274, 375, 431]. Istnieją jednak pewne dane świadczące o możliwości zastosowania PFP w celu wybiórczej selekcji haploidalnych linii kalusa. Porównawcze obserwacje dotyczące wzrostu, liczby chromosomów i zawartości DNA w di- i haploidalnym kalusie *N. tabacum* [158, 159, 191, 278] i *N. glauca* × *N. langsdorfii* [377] na pożywce z PFP wykazały, że analog ten zapobiega diploidyacji haploidalnego kalusa oraz powoduje częściową haploidyację lub zahamowanie wzrostu kalusa diploidalnego. Dane te nie znalazły jedynie potwierdzenia w przypadku kalusa *N. sylvestris* [98]. Na podstawie obserwacji dotyczących wpływu PFP na różne linie haploidalnego kalusa, autorzy sugerują, że wrażliwość na działanie tego analogu uwarunkowana jest nie tylko przez poziom ploidalności komórek, ale również przez genotyp.

g. Tło genetyczne. Pozytywne wyniki indukcji u niektórych gatunków, a negatywne u innych wskazują, że różne genotypy odmiennie reagują na warunki androgenozy. Na przykład w rodzaju *Nicotiana* [286] indukcja jest łatwiejsza w przypadku gatunków poliploidalnych czy też pochodzenia mieszańcowego. Często również możliwe jest otrzymanie haploidów mieszańca międzygatunkowego [204, 222, 294], a podobne próby u form rodzicielskich nie dają wyników. Porównanie szeregu gatunków w obrębie rodzaju *Oryza* [155, 156] wykazało, że gatunki pierwotniejsze lepiej reagują na warunki indukcji. Różna reakcja poszczególnych odmian, linii czy mutantów w obrębie jednego gatunku [48, 287, 305, 320, 384] wskazuje, że genotyp jest w tym procesie istotnym czynnikiem.

Według niektórych badaczy [313] możliwość indukcji rozwoju haploidalnego wiąże się z określonymi warunkami wewnątrz i w otoczeniu pylnika. W normalnych warunkach *in vivo* mikrospory rozwijają się zgodnie z planem w gametofit męski. Natomiast *in vitro* lub przy zmianie warunków *in vivo* tendencja rozwoju gametofitycznego zostaje osłabiona lub zahamowana. Jednym z czynników indukcji może być zatem neutralizacja tej tendencji. Jeżeli zahamowanie normalnego rozwoju gametofitycznego jest całkowite, następuje przekształcanie się mikrospor w zarodki; natomiast jeżeli następuje tylko osłabienie normalnej tendencji rozwojowej, powstaje z nich niezróżnicowany kalus. Być może u gatunków, dających negatywne wyniki indukcji androgenozy *in vitro*, uwarunkowana genetycznie tendencja rozwoju gametofitycznego jest tak silnie ustabilizowana, że nie reagują one na żadne czynniki. W takich przypadkach indukcja mogłaby stać się możliwa przez poddanie roślin, pączków czy pylników warunkom znacznie odbiegającym od normalnych. Czynnikiem zwiększającym efektywność indukcji mogłyby być:

1. Szoki termiczne: dla roślin, u których mikrosporogeneza zachodzi w wyższej temperaturze, skuteczne byłyby szoki temperatury niższej i odwrotnie. Badania Noreel [296] wykazały, że u *N. tabacum* podziały mikrospor są częstsze jeżeli rośliny, z których pobiera się pylniki przechowuje się przez pewien czas w temperaturze 3°C. Metoda ta znalazła również zastosowanie przy pobudzaniu do podziału izolowanych mikrospor.

2. Egzogenne regulatory wzrostu: w zależności od stadium rozwojowego czy pozycji pąka kwiatowego na roślinie, poziom endogennych substancji wzrostowych może być różny. Celowe byłoby zatem pobieranie pylników z określonych części kwiatostanu, lub można by zastosować spryskiwanie pączków substancjami wzrostowymi na pewien okres przed wyszczepieniem pylników. Badając wpływ spryskiwania roślin *Ethre-*

lem u *Triticum*, Bennett i Hughes [19] stwierdzili m.in. obecność dodatkowych mitoz w ziarnach pyłku. Zastosowanie tej metody w hodowli pylników in vitro u *Allium*, *Lotus*, *Lycopersicum*, *Capsicum*, *Medicago* i *Tradescantia* nie dało jednak wyników [99]. U żadnego z badanych gatunków nie uzyskano zwiększenia częstości podziałów mikrospor w porównaniu z kontrolą; obserwacje mikroskopowe świadczyły raczej o nie-normalnym przebiegu podziałów ziaren pyłku niż o indukcji podziałów dodatkowych. Hodowla pylników *Triticum aestivum* [321] wykazała natomiast, że częstość tworzenia kalusa z ziaren pyłku zależna jest od pozycji pylników w obrębie kłosa.

3. Wykorzystanie cechy męskiej sterylności: ponieważ u roślin męsko sterylnych normalny rozwój mikrospor jest zahamowany, tendencję w kierunku rozwoju gametofitycznego można uznać za osłabioną. W indukcji androgenezy in vitro mogłaby być to cecha pożądana. Dotychczas udało się otrzymać haploidy u częściowo sterylnego mieszańca *Festuca* × *Lolium* [294] oraz u męsko sterylnych form pszenicy [320, 321]. Ponadto wykazano [21], że izolowane mikrospory *N. tabacum* hodowane w kontakcie z pylnikami męsko sterylnej formy *Petunia hybrida* dzielą się z wyższą częstością niż w kontakcie z pylnikami normalnymi.

4. Mutageneza: w pylnikach roślin napromieniowanych obserwowano często androgeny rozwój mikrospor; również zapyłając rośliny napromienionym pyłkiem otrzymywano rośliny haploidalne. W androgenezie in vitro stymulacja za pomocą promieniowania mogłaby zwiększać częstość indukcji. Sugestie te znalazły potwierdzenie w indukcji androgenezy u *Nicotiana* [95, 96, 97] i *Secale* [382].

5. Wirowanie: badanie wpływu różnych czynników na różnicowanie się ziaren pyłku u *Lilium* [172] wykazało, że wirowanie pylników powoduje przemieszczenie organelli, zmianę biegunowości komórek i nieprawidłowy przebieg mikrosporogenezy. Wirowanie pylników *Nicotiana* przed ich wyszczepieniem in vitro [403] powodowało, że zarodki tworzyły się z większą częstością i średnia liczba siewek z pylnika w porównaniu z kontrolą była wyższa. Tą samą metodą udało się zaindukować rozwój kalusa z pyłku u *Pinus* [33].

## 2. METODY DIPLOIDYZACJI I ROZMNAŻANIA HAPLOIDÓW

In vitro otrzymuje się zwykle zbyt małą ilość haploidalnych roślin, co ograniczałoby ich szersze zastosowanie. Opracowano więc szereg metod rozmnażania haploidów w celu uzyskania dużych populacji. Są to metody rozmnażania wegetatywnego [215, 344], regeneracji z merystemów wierzchołkowych [344, 346], hodowli in vitro fragmentów roślin [95, 344], kalusa [288] oraz izolowanych komórek [202].

Ponieważ rośliny haploidalne są z reguły sterylne, zachodzi konieczność przywrócenia ich płodności. Podwojenie liczby chromosomów indukuje się działaniem kolchicyny we wczesnych stadiach rozwoju roślin [49, 402] lub dodaniem jej do pożywki zawierającej komórki haploidalne [346]. Często diploidyzacja zachodzi *in vitro* samorzutnie we wczesnych stadiach rozwoju mikrospor [391] lub w kalusie [225, 288].

### 3. POZIOM PLOIDALNOŚCI ROŚLIN OTRZYMYWANYCH Z HODOWLI PYLNIKÓW IN VITRO

Okazało się, że nie tylko w przypadku indukcji poprzez kalus, ale również w bezpośredniej embriogenezie powstają rośliny o różnym poziomie ploidalności. Aby zbadać podstawy tego zjawiska przeprowadzono szczegółowe badania w obrębie jednego gatunku [111], a następnie wśród kilku gatunków [113]. Stwierdzono, że poziom ploidalności roślin zależy w pewnym stopniu od stadium rozwojowego pąka w momencie wyszczipiania pylników; im stadium rozwojowe jest późniejsze, tym wyższy jest poziom ploidalności otrzymanych roślin. W dalszych badaniach stwierdzono, że zjawisko to przejawia się u poszczególnych gatunków w różnym stopniu. Analiza trzech spokrewnionych ze sobą gatunków wykazała, że u *Nicotiana tabacum* występuje zawsze przewaga haploidów, u *Datura innoxia* — osobniki o liczbie chromosomów  $1n-3n$ , natomiast u *Petunia axillaris* przeważnie triploidy. Przypuszczano zatem, że mechanizmy powstawania niehaploidalnych roślin u poszczególnych gatunków mogą być różne i zależne od wielu czynników. Rozwój roślin di- i triploidalnych tłumaczono zjawiskami endomitozy lub zlania jąder we wczesnych stadiach embriogenezy. Sugestie te znalazły potwierdzenie w analizie cytologicznej początkowych stadiów rozwoju mikrospor *in vitro* u *Nicotiana*, *Datura* i *Paeonia* [391, 392]. Podsumowując wyniki tej analizy i dane dotyczące kilku innych gatunków, opisano trzy typy podziału jądra mikrospory w warunkach *in vitro*:

a. Asymetryczny (u *Nicotiana*, *Hordeum*, *Datura metel*, *Triticum aestivum*, *Capsicum annuum*, *Paeonia hybrida*), w którym jądro wegetatywne uczestniczy w androgenezie. Jądro generatywne nie bierze udziału w tym procesie, nie dzieli się w ogóle, lub jego podziały są opóźnione w stosunku do jądra wegetatywnego, a produkty podziału zwykle degenerują. Powstanie diploidów w tym przypadku tłumaczy się endomitozą w komórce wegetatywnej ziarna pyłku.

b. Symetryczny (u *Nicotiana*, *Datura innoxia*, *Triticum aestivum*, *Triticale*, *Capsicum annuum*), w którym jądro mikrospory nie dzieli się na wegetatywne i generatywne, ale na dwa jednakowe jądra. Powstanie takich „odróżnicowanych” jąder związane jest z określoną pozycją wrze-



ciona podziałowego, które umieszczone jest w komórce bardziej centralnie [290] niż przy normalnym podziale jądra mikrospory. Działanie niskiej temperatury przed wyszczepianiem pylników [284] zwiększa proporcję tego typu ziaren. Niepełna cytokineza po podziale takich jąder lub wytworzenie wspólnego wrzeciona może doprowadzić do ich zlania i wytworzenia diploidalnych zarodków.

c. Jednoczesne podziały zarówno jądra vegetatywnego, jak i generatywnego, prowadzące z reguły do powstawania zarodków o wyższym niż  $2n$  poziomie ploidalności. Po replikacji DNA przed mitozą jądra generatywnego może dojść do zlania z jądrem vegetatywnym i powstania zarodków triploidalnych. Zachodzi również możliwość jednoczesnego wystąpienia endomitoz i zlewania jąder w wyniku czego powstają zarodki tetra- i heksaploidalne. Ten typ rozwoju mikrospor stwierdzono tylko u *Datura innoxia*, ale przypuszcza się, że występuje również w przypadku innych gatunków tworzących zarodki o niehaploidalnej liczbie chromosomów.

Wydaje się, że jakkolwiek wszystkie typy podziału mikrospor są funkcjonalne, to który z nich w danym przypadku daje początek embriogenezie może zależeć od gatunku, warunków hodowli, fazy cyklu komórkowego w jakiej znajdują się mikrospory oraz warunków w obrębie pylnika i wzajemnej konkurencji komórek wynikającej z pozycji w pylniku, polarności mikrospor, płaszczyzny podziału jąder itd. Selekcja mikrospor potencjalnie androgennych i zarodków o różnym poziomie ploidalności byłaby zatem wieloczynnikowa.

#### 4. FORMY ALBINOTYCZNE

Duży problem w hodowli haploidów stanowią rośliny bezchlorofilowe, które przeżywają tylko do pewnego stadium rozwoju, są więc bezużyteczne.

Z badań nad różnicowaniem się chloroplastów *in vitro* u wielu gatunków wynika, że warunki hodowli są krytyczne dla prawidłowego rozwoju plastydów i syntezy chlorofilu w hodowanych komórkach i tkankach. Dostatecznie ważną rolę w tych procesach odgrywa koncentracja sacharozy i typ oraz stężenie egzogennych auksyn. Na przykład 2,4D hamuje syntezę chlorofilu [86], a podobny efekt wywołuje duże stężenie sacharozy w pożywce. Badania ultrastrukturalne [87, 311] wykazały jednocześnie, że substancje te powodują nieprawidłowy rozwój lub degenerację mitochondriów i plastydów. Po zastąpieniu 2,4D przez odpowiednie stężenia NAA nie obserwowano podobnych anomalii. Inne obserwacje [183, 217, 367] wykazały, że synteza chlorofilu stymulowana jest przez cytokininy lub cukry proste, w przeciwieństwie do złożonych.

Podobne zależności mogą mieć miejsce w hodowli haploidów. Clapham [63] stwierdził wyraźny wpływ dużej zawartości sacharozy na częstość pojawiania się form albinotycznych u haploidów jęczmienia. Badania ultrastrukturalne albinotycznych haploidów ryżu [386] wykazały, że w tkance liści występują plastydy, ale nie rozwijają się one w normalne chloroplasty. Prawidłowe różnicowanie chloroplastów zależne jest również od warunków świetlnych i wilgotności. W przypadku zatem występowania omawianych trudności konieczne jest przeprowadzanie odpowiednich obserwacji i ich ścisła korelacja z warunkami hodowli.

#### 5. ANALIZA PIERWSZYCH ETAPÓW ANDROGENEZY

Na gatunkach, u których metody otrzymywania haploidów zostały już dobrze opracowane, przeprowadza się badania dotyczące zmian cytologicznych, cytochemicznych i ultrastrukturalnych, podczas androgenego różnicowania się mikrospor. Celem tych prac jest poznanie mechanizmów komórkowych kierujących procesem indukcji, a tą drogą ułatwiona byłaby również eksperymentalna kontrola procesu androgeny in vitro.

Obserwacje mikroskopowe embriogennych i nieembriogennych ziaren pyłku *Nicotiana* [388, 430] wykazały, że różnią się one morfologicznie. Następuje przede wszystkim zmiana intensywności zabarwienia komórek po reakcji Feulgena; ziarna nieembriogenne, podobnie jak ziarna pyłku w warunkach naturalnych, mają ciemno zabarwioną cytoplazmę, z dużą ilością skrobi i słabo widoczne jądra. Natomiast w ziarnach embriogennych cytoplazma nie barwi się, a jądra stają się wyraźnie widoczne. Zmiany te mogą być odbiciem różnej aktywności metabolicznej poszczególnych typów ziaren. W procesie indukcji następuje również reorganizacja strukturalna komórek [415, 416], zanik wakuoli i intensywna działalność lizosomów. Organelle komórkowe przesuwają się od ścian i grupują wokół jądra. Obserwuje się ponadto uproszczenie struktury plastydów i mitochondriów. Po pierwszym podziale jądra zwiększa się liczba mitochondriów i następuje aktywna synteza DNA. Opisane zjawiska związane są prawdopodobnie ze zmianą warunków in vivo na in vitro i odróżnicowaniem komórek. Przedmiotem szczegółowych badań są ponadto zmiany ultrastrukturalne związane z różną aktywnością jądra wegetatywnego i generatywnego w procesie embriogenezy [107–109].

Są również próby ilościowego ujęcia zmian metabolicznych. Przeprowadzono analizę spektrofotometryczną [23] zawartości kwasów nukleinowych i białek w ziarnach pyłku w momencie wyszczepiania oraz po pewnym czasie hodowli w ziarnach embriogennych i nieembriogennych. W dwu ostatnich typach ziaren zawartość DNA w porównaniu

z wyjściową była podwojona. Zawartość białek w ziarnach embriogenicnych była podobna jak w momencie wyszczepiania, natomiast ilość RNA — wyraźnie zredukowana. W ziarnach nieembriogenicnych stwierdzono kilkakrotnie wyższą zawartość RNA i białek w porównaniu z wyjściową. Ziarna nieembriogenne zachowują się więc *in vitro* podobnie jak ziarna pyłku w warunkach naturalnych, następuje w nich akumulacja RNA i białek. Natomiast indukcja nietypowego rozwoju mikrospor związana jest nie tylko z zahamowaniem syntezy RNA i białek, ale również z pewną degradacją RNA.

#### 6. MOŻLIWOŚĆ HODOWLI IZOLOWANYCH MIKROSPOR

Prawie równocześnie z początkiem indukcji androgenezy *in vitro* poprzez hodowanie pylników wyłonił się problem, czy możliwa jest hodowla izolowanych mikrospor i regeneracja ich w rośliny haploidalne. Szereg prób w tym kierunku dawał wyniki negatywne, ponieważ na tych samych pożywkach, w których indukcja androgenezy w obrębie pylnika była możliwa, lub na modyfikacjach tych pożywek izolowane mikrospory nie miały zdolności do podziałów [20, 286, 317, 378]. Ponadto w wielu przypadkach obserwowano w androgennych zarodkach obecność pseudowieszadełek [198, 286], co wskazywało, że przynajmniej pierwsze stadia embriogenezy są ściśle zależne od dopływu jakichś aktywnych substancji pochodzących z tkanek somatycznych pylnika. Próbowano hodować izolowane mikrospory w kontakcie z pylnikami [21, 368], ale dawało to pozytywne wyniki tylko w sporadycznych przypadkach.

Bliżej nieokreślony „efekt pylnika” został potwierdzony statystycznie [317]. Próby zidentyfikowania jego charakteru zapoczątkowały interesującą serię badań [316, 317]. Przenoszono izolowany w optymalnym dla indukcji stadium pyłek jednego gatunku do pylników tego samego lub innego gatunku. Zastosowane metody nie wpływały ujemnie na proces androgenezy. W pierwszym etapie wykorzystano dwie odmiany *Nicotiana* różniące się cechami morfologicznymi, co pozwalało na odróżnienie w bardzo wczesnych stadiach rozwoju formy pochodzące od jednej czy drugiej odmiany w obrębie pylnika. Przeprowadzona w obu kierunkach transplantacja wykazała, że rozwijają się zarówno mikrospory macierzyste, jak i wprowadzone. W dalszych etapach wykonano analogiczne próby z transplantacją mikrospor tytoniu do pylników *Petunia*. I w tym przypadku otrzymano podobne wyniki, co wskazywałoby, że androgenny rozwój mikrospor jednego gatunku może być pobudzany przez tkanki pylników innego spokrewnionego gatunku. W innej serii badań wykazano, że funkcje tkanek pylnika mogą być zastąpione przez inne tkanki

somatyczne. Hodowano izolowane mikrospory *N. tabacum* w kontakcie z fragmentami różnych części kwiatu i liści oraz kalusem *N. tabacum* i *Petunia hybrida*. Rozwój mikrospor następował tylko w kontakcie z kalusem pochodzącym z płatków *Petunia*. Przy tym sam kalus nie miał zdolności do różnicowania, ale stymulował rozwój izolowanych mikrospor obcego gatunku. Jakkolwiek wyniki tych badań są ciekawe, brak ich interpretacji. Ewentualne wykrycie analogii między składem chemicznym kalusa z płatków *Petunia* i tkanek somatycznych pylników *Nicotiana* umożliwiłoby identyfikację czynników indukujących rozwój izolowanych mikrospor.

Jedną z pierwszych, częściowo skutecznych prób hodowli całkowicie izolowanych mikrospor [26] przeprowadzono u *Petunia hybrida*. Na specjalnie dobranej, nietypowej pożywce udało się doprowadzić rozwój mikrospor do stadium globularnego. Pełnym natomiast sukcesem zakończyły się próby indukcji androgenezy w izolowanych mikrosporach *N. tabacum*, *N. sylvestris* i *D. innoxia* [282–284]. Zastosowano w tym przypadku działanie niskiej temperatury na rośliny na pewien okres przed wyszczepieniem, następnie izolowane w optymalnym stadium pylniki hodowano przez krótki czas na normalnie stosowanej do tego celu pożywce, w końcu izolowano pyłek do pożywki płynnej z dodatkiem ekstraktu z embriogennych pylników. Uzyskano w ten sposób pełną regenerację mikrospor w rośliny. W przypadku *Nicotiana* porównano ponadto skład chemiczny ekstraktu z pylników nieembriogennych (tuż po wyszczepieniu) i embriogennych (po pewnym okresie hodowli). Okazało się, że w przeciwieństwie do nieaktywnego, ekstrakt aktywny nie zawierał proliny, miał natomiast znacznie wyższą zawartość seryny. Na tej podstawie opracowano całkowicie syntetyczną pożywkę, na której uzyskano pełną regenerację. Analogiczne wyniki powtórzono na innej odmianie *Nicotiana* [351]. Podobnymi metodami udało się również [94] doprowadzić rozwój mikrospor *Lycopersicum esculentum* do stadium globularnego.

Wyniki tych badań mają dość istotne konsekwencje ponieważ wykazały, że możliwa jest indukcja rozwoju mikrospor poza pylnikiem i w ostateczny sposób udowodniły totipotencję wysoko wyspecjalizowanych komórek sporogennych. Ponadto stanowią one nowy etap w badaniu czynników indukujących androgenezę. Izolowane mikrospory będzie można hodować w innych, mniej optymalnych warunkach, badać ich reakcję oraz ustalać precyzyjniej warunki indukcji, co w obrębie pylnika nie było możliwe. Stwarza to możliwość opracowania systemu kontrolnego, w którym manipulacja kilkoma zmiennymi czynnikami pozwoliłaby na analizowanie dwu alternatywnych warunków, z których tylko jeden dawałby androgenezę. Hodowla izolowanych mikrospor stanowi również

idealny system eksperymentalny do badania efektów mutacji na jednorodną genetycznie i haploidalną populację komórek.

Na zakończenie należy jeszcze wspomnieć o innej potencjalnej możliwości otrzymywania haploidów drogą izolowania protoplastów z tetrad. Badania te nie są jeszcze jednak dostatecznie zaawansowane i zostaną omówione w innej części artykułu.

## II. HODOWLA PROTOPLASTÓW

Próby izolowania protoplastów z różnych tkanek roślinnych przeprowadzano od dawna. Była to jednak metoda izolacji mechanicznej polegająca na rozbiciu tkanki i plazmolizie komórek, umożliwiająca otrzymywanie protoplastów tylko ze zróżnicowanych tkanek. Obecnie stosowana metoda enzymatyczna [66, 357] pozwala na izolację protoplastów również ze słabo zwakuolizowanych komórek merystematycznych.

Metoda ta polega na poddaniu fragmentów tkanek działaniu enzymów rozkładających celulozę i pektyny. Najczęściej stosowane ekstrakty enzymatyczne pochodzą z bakterii, grzybów i ślimaków. Trawienie enzymami przeprowadzane jest w warunkach niezbyt silnej plazmolizy. Ma ona efekt stabilizujący i powoduje, że komórki stają się mniej podatne na szkodliwe działanie preparatów enzymatycznych; zapewnia ponadto całkowitą izolację protoplastów. W charakterze stabilizatorów osmotycznych używa się najczęściej sorbitolu lub mannitolu, rzadziej sacharozy. Po dokładnym usunięciu enzymów protoplasty oddziela się od pozostałości ścian poprzez wirowanie i umieszcza w pożywce stałej lub płynnej. Pod warunkiem właściwego stosowania metod izolacji w protoplastach następuje stosunkowo szybka regeneracja ścian, a następnie na odpowiednich pożywkach — podziały komórkowe i tworzenie kolonii, niekiedy nawet kalusa zdolnego do różnicowania.

W tabeli 2 zestawiono dotychczasowe wyniki hodowli protoplastów. Udało się je otrzymać z różnych tkanek i u wielu gatunków. W większości przypadków osiągnięto jednak jedynie izolację, rzadziej udało się uzyskać podziały protoplastów, w sporadycznych przypadkach nastąpiła częściowa regeneracja, a tylko u trzech gatunków otrzymano pełną regenerację protoplastów w rośliny. Trudności występujące przy hodowli protoplastów stanowią na razie barierę dla szeregu dalszych badań. Tym niemniej skuteczna izolacja jest warunkiem wstępnym i zanim inne badania staną się realne, konieczne jest ustalenie wymagań dla poszczególnych gatunków.

TABELA 2. Hodowla protoplastów

Lp.	Gatunek	Metoda usunięcia ścian	Pożywka	Źródło protoplastów	Literatura	
1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Acer pseudoplatanus</i>	P+C		zawiesina kom.	355	
2	<i>Agave toumenicna</i>	M+C		kalus	364	
3	<i>Allium cepa</i>	P+C		zawiesina kom.	116	
4	<i>Allium fistulosum</i>	M+C, G		korzenie	323, 325	
5	<i>Amaranthus graecizans</i>	M+C		liście	353	
6	<i>Amaryllis belladonna</i>	P→C		liście	306	
7	<i>Anthrinum majus</i>	C		liście	208	
8	<i>Arachis hypogaea</i>	C		pyłek	76	
9	<i>Avena sativa</i>	Z	NT	tetrady PMC	420	
10	<i>Begonia semperflorens</i>	M+C	MS	zawiesina kom.	186, 362	
11	<i>Beta vulgaris</i>	M+C, G+C	NT, W	liście	118	
12	<i>Brassica chinensis</i>	M+C, MC	NT, W	koleoptyl	160, 358	
13	<i>Brassica napus 1n</i>	M+C	NT	liście	420	
14	<i>Brassica napus 2n</i>	G		korzenie	325	
15	<i>Brassica oleraces</i>	P+C		korzenie	205	
16	<i>Brassica pekinensis</i>	P+C		liście	429	
17	<i>Centaurea cyanus</i>	M→C	NT	liście	420	
18	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	P+C	NT	liście	205	
19	<i>Chichorium endivia</i>	M→C	NT, W	liście	420	
20	<i>Citrus sp.</i>	M+MC		liście	90	
21	<i>Coleus blumei</i>	P→C	MS	zawiesina kom.	306	
22	<i>Colocasia esculenta</i>	P+C	MS	kalus	362	
	<i>Crepis capillaris</i>	P→C		liście	410	
		P→C		liście	306	
		P+C		zawiesina kom.	306	
		P+C		zawiesina kom.	116	

Izolacja

TABELA 2. — cd.

1	2	3	4	5	6	7
	23	<i>Cryptotenia japonica</i>	P→C		liście	306
	24	<i>Datura metel</i>	H	W	tetrady PMC	341
	25	<i>Datura tatula</i>	M+C	LS	zawiesina kom.	445
	26	<i>Daucus carota</i>	P+C	G	liście	145
	27	<i>Dianthus caryophyllus</i>	M+C	NT	płatki	420
	28	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Z	NT	tetrady PMC	420
	29	<i>Dioscorea composita</i>	P+C, C		liście	137, 208
	30	<i>Glycine maxima</i>	M+C		kalus	364
	31	<i>Hawotrchia hess</i>	M+C+R		brodawki korz.	89
	32	<i>Helianthus annuus</i>	M+C, CL+C	NT	kalus	420
	33	<i>Hordeum vulgare</i>	P+C	MS	zawiesina kom.	362
	34	<i>Hyacinthus orientalis</i>	M+C, P+C	NT, W	liście	118, 212, 395, 420
	35	<i>Lactuca sativa</i>	G+C	G	aleuron	200, 396
	36	<i>Lillium longoifrum</i>	P→C		liście	306
	37	<i>Linum usitatissimum</i>	P→C		liście	306
	38	<i>Lupinus polyphyllus</i>	P+C		zawiesina kom.	362
	39	<i>Lycopersicum esculentum</i>	M+C		PMC	193, 194
	40	<i>Lycopersicum peruvianum</i>	HC	G	zawiesina kom.	218
	41	<i>Lycopersicum pimpinellifolium</i>	M+C+R		brodawki korz.	89
	42	<i>Mathiola incana</i>	M→C, M+C	NT	liście	306, 409, 420
	43	<i>Melilotus alba</i>	P+C	MS	zawiesina kom.	362
	44	<i>Mimulus hybrida</i>	PE+PG		owoc	11, 35
	45	<i>Narcissus tazetta</i>	PE+PG		owoc	11, 340
	46	<i>Nemesia strumosa</i>	PE+PG		owoc	11
	47	<i>Nicotiana glutinosa</i>	C	NT	płatki	420
			HC	G	zawiesina kom.	218
			M→C		płatki	329
			P→C		liście	306
			M→C		płatki	329
			M+C	MS	zawiesina kom.	336, 353, 362, 364

Izolacja

TABELA 2. — cd.

1	2	3	4	5	6	7
48	<i>Nicotiana glauca</i>		M→C		płatki	329
49	<i>Nicotiana glauca</i>		H		pyłek, tetrazy	22
50	<i>Nicotiana glauca</i>		M+C	MS, LS	zawiesina kom.	186, 445
	<i>Nicotiana glauca</i>		C+H+M+R		pyłek	9
51	<i>Oryza sativa 1n</i>		H	NT, MS	tetrazy PMC	6, 22
	<i>Oryza sativa 1n</i>		M+C		płatki	412
	<i>Oryza sativa 2n</i>		CL+C	NT	kalus	420
	<i>Oryza sativa 2n</i>		CL+C	NT	kalus	420
	<i>Oryza sativa 2n</i>		M+C		liście	240
52	<i>Panicum capillare</i>		C		liście	208
53	<i>Panicum maximum</i>		C		liście	208
54	<i>Panicum miliaceum</i>		C		liście	208
55	<i>Papaver rhoeas</i>		M+C	LS	płatki	445
56	<i>Pelargonium hortorum</i>		P+C	MS	zawiesina kom.	362
57	<i>Petroselinum hortense</i>		P+C	MS	zawiesina kom.	362
58	<i>Petunia hybrida</i>		P→C		zależki	327
	<i>Petunia hybrida</i>		H		tetrazy PMC	22
	<i>Petunia hybrida</i>		C+H+M+R		pyłek	9
59	<i>Platanus occidentalis</i>		P+C	MS	zawiesina kom.	362
60	<i>Portulaca oleracea</i>		C		liście	208
61	<i>Pyrus communis</i>		P+C	MS	zawiesina kom.	362
62	<i>Raphanus sativus</i>		M→C	NT	liście	420
	<i>Raphanus sativus</i>		G		korzenie	325
63	<i>Rauwolfia serpentina</i>		M+C	LS	zawiesina kom.	445
64	<i>Rubus fruticosus</i>		M+C		kalus	364
65	<i>Saccharum officinarum</i>		C		liście	208
66	<i>Secale cereale 1n</i>		P+C		liście	429
	<i>Secale cereale 2n</i>		M+C, P+C	NT, W	liście	118, 119
	<i>Secale cereale 2n</i>		H		tetrazy PMC	22
67	<i>Setaria faberii</i>		C		liście	208



TABELA 2. — cd.

1	2	3	4	5	6	7
Izolacja	68	<i>Solanum melongena</i>	M+C		liście	409
	69	<i>Solanum nigrum</i>	PG		owoc	11, 340
	70	<i>Solanum tuberosum</i>	M+C+H		bulwy	238
	71	<i>Sorghum bicolor</i>	P+C	MS	liście	208
	72	<i>Spinnacia oleracea</i>	P+C		zawiesina kom.	362
	73	<i>Taraxacum sp.</i>	P→C, G		liście	306, 325
	74	<i>Torenia bailloni</i>	G		liście	325
	75	<i>Torenia fournieri</i>	P→C		płatki	328
	76	<i>Trillium kamschaticum</i>	P→C		płatki	328
	77	<i>Triticum aestivum</i>	M+C	NT, W	PMC	193, 194
	78	<i>Vicia faba</i>	M→C, P+C M+C+H+R	MS, W	liście	118, 119, 420
79	<i>Vitis vinifera</i>	H		pyłek	9	
80	<i>Valerianella olitoria</i>	P+C	NT, W	tetrady PMC	6, 22	
81	<i>Zea mays</i>	P+C	MS, W	zawiesina kom.	362	
Podziaty	1	<i>Allium fistulosum</i>	P→C	MS	liście	207
	2	<i>Ammi visnaga</i>	C+HC	G	zawiesina kom.	122, 301
	3	<i>Antirrhinum majus</i>	M+C, M→C	NT	liście	326, 420, 428
	4	<i>Atropa belladonna</i>	H	MS, W	tetrady PMC	6, 8
	5	<i>Bromus inermis</i>	D+P	G	zawiesina kom.	169, 211
	6	<i>Calystegia sepium</i>	H	H	liście	164, 165
	7	<i>Convolvulus arvensis</i>	MC		zawiesina kom.	13, 190, 358
	8	<i>Cucumis sativus</i>	P→C, P+C	H	liście	85, 306

TABELA 2. — cd.

1	2	3	4	5	6	7	
Podziaty	9	<i>Glycine maxima</i>	P+C, P+C+R	G, MS	zawiesina kom.	169, 209, 210, 212, 219, 255,	
	10	<i>Gossypium hirsutum</i>	P+C	NT	zalażki	15 362	
	11	<i>Haplopappus gracilis</i>	C		zawiesina kom.	115, 210	
	12	<i>Helianthus tuberosus</i>	M→C	NT	bulwy	3	
	13	<i>Ipomoea hederifolia</i>	H	H	liście	164, 165	
	14	<i>Nicotiana glauca</i>	M+C	NO, NT	liście	37, 59	
	15	<i>Nicotiana langsdorffii</i>	M+C	NO, NT	liście	37, 59	
	16	<i>Nicotiana otophora</i>	M+C	NO	liście	37	
	17	<i>Nicotiana rustica</i>	M+C	NO	liście	37	
	18	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	M+C, M+MC	NT	narośla	335, 366	
	19	<i>Phaseolus vulgaris</i>	P+C	G	liście	314	
	20	<i>Pisum sativum</i>	M+MC, HC	NT, W, G	liście	78, 90, 212, 428	
	21	<i>Saccharum officinarum</i>	C		korzenie	32, 230	
	22	<i>Vicia hajastana</i>	P+C	G	wierzch. pędu	131	
	23	<i>Vitis vinifera</i>	G+C	W	zawiesina kom.	245	
	24	<i>Zea mays</i>	P+D, P+C+R	G	zawiesina kom.	78, 169, 211, 212, 219	
	Klaus zdolny do zróżnicowania	1	<i>Asparagus officinalis</i>	M+C	BM	gałęziaki	39, 40, 239
		2	<i>Atropa belladonna</i>	P+C		zawiesina kom.	143
		3	<i>Brassica napus</i>	D+C+H	G	liście	214
		4	<i>Oenothera hookeri</i>	P+C	NT	liście	246
		5	<i>Pharbitis nil</i>	P→C	NO	liścienie	250
		6	<i>Vigna sinensis</i>	M+MC	NT, MS, B	liście	91
	Rośliny	1	<i>Daucus carota</i>	P+C, HC+C	G	zawiesina kom.	130, 145, 171, 206
		2	<i>Nicotiana tabacum 1n</i>	P→C	NO	miększ liści	292, 302
3		<i>Nicotiana tabacum 2n</i>	P→C, M+C	NT, MS	miększ liści	263, 264, 397, 399, 400, 413	
		<i>Petunia hybrida 1n</i>	M+MC	NT, MS	epiderma liści	92	
		<i>Petunia hybrida 2n</i>	P→C, P+C	NT	miększ liści	27, 29	
		P→C,	NO, NT	miększ liści	100, 110, 126, 175		

## 1. WARUNKI IZOLACJI I HODOWLI PROTOPLASTÓW

Skuteczność izolacji zależy od wielu parametrów: gatunku, typu organu lub tkanki, stanu fizjologicznego i wieku rośliny, charakteru i koncentracji stabilizatora osmotycznego, koncentracji enzymów, czasu inkubacji, pH, temperatury itd. [50, 407]. Oznacza to, że każdy obiekt należy analizować oddzielnie pod względem poszczególnych wymagań, ale istnieje jednocześnie możliwość operowania dużą ilością wariantów, co pozwala na dobranie warunków w zasadzie dla każdego gatunku. W izolacji i dalszej hodowli odgrywa rolę szereg czynników, które zostaną pokrótce omówione. Są to:

a. Źródło komórek: mogą to być zarówno tkanki zróżnicowane, jak i merystematyczne, tkanka sporogenna, kalus czy zawiesina komórek hodowanych w pożywce płynnej.

Ponieważ metody hodowli *in vitro* dla niektórych gatunków są już opracowane, spodziewano się, że kalus i zawiesina komórek będą dobrym źródłem protoplastów. Rozproszenie komórek w zawieszynie stwarza dogodne warunki do penetracji enzymów hydrolitycznych, hodowane *in vitro* tkanki charakteryzują się ponadto większą jednorodnością fizjologiczną niż pobrane bezpośrednio z roślin. Okazało się jednak, że protoplasty wyizolowane z hodowanych komórek i tkanek nie są trwałe i wymagają do wzrostu i podziałów nieco innych pożywek niż standardowe dla hodowli *in vitro* danego gatunku. Problemy te udało się zresztą częściowo rozwiązać. Stwierdzono, że na stabilność protoplastów wpływa wiek hodowli, z której pochodzą komórki. Większą żywotność i trwałość mają protoplasty wyizolowane z aktywnie rosnącego kalusa czy hodowli komórek w fazie logarytmicznej [68]. Hodowane komórki można ponadto przystosować do warunków wysokiego ciśnienia osmotycznego przenosząc je na pewien okres przed usunięciem ścian na pożywki stosowane dla protoplastów.

Przy izolowaniu protoplastów z tkanek *in situ* istotną rolę odgrywa stadium rozwojowe, stan fizjologiczny oraz warunki wzrostu roślin [214, 314], szczególnie temperatura i wilgotność. Najlepiej do tego celu nadają się rośliny młode, bujne, o odpowiednim turgorze. Poszczególne gatunki i odmiany reagują różnie na warunki izolacji i hodowli [259].

b. Warunki degradacji enzymatycznej: stosuje się dwie podstawowe

---

Objaśnienia: a. Enzymy: C — celulaza, CL — kolonaza, D — driselaza, G — glusulaza, H — helikaza, HC — hydrocelulaza, M — macerozym (pektynaza), MC — meicelaza (celulaza), P — pektynaza, PE — pektynesteraza, PG — poligalakturonaza, R — rhozym, Z — zymolaza,

b. Pożywki jak tab. 1. NO — Nitsch i Ohyama (1971), NT — Nagata i Takebe (1971), H — Harada (1973), BM — Bui - Dang - Ha i Mackenzie (1973)

metody trawienia, jednoetapową (działanie mieszaniną celulazy i pektynazy) i dwuetapową (działanie najpierw pektynazą, a następnie celulazą). W niektórych przypadkach wystarcza stosowanie tylko jednego enzymu [208, 218, 340, 363] lub konieczne jest stosowanie mieszaniny kilku enzymów [89, 214, 238]. Wybór metody degradacji jest dosyć istotny, ponieważ jej skuteczność zależy od gatunku czy typu tkanki. Ważne jest poza tym pH, stężenie enzymu i czas inkubacji. Czas trawienia wynosi od kilkudziesięciu minut do kilkunastu godzin; dla zachowania żywotności protoplastów powinien być możliwie jak najkrótszy. Stosowanie mieszaniny enzymów [427] wymaga dłuższego czasu inkubacji. Degradację ścian można przyspieszyć wirowaniem; używanie enzymów odsolonych [119, 210] skraca również czas inkubacji. Sukteczność poszczególnych preparatów enzymatycznych zależy od obiektu, ale duże znaczenie ma ich czystość, brak zanieczyszczeń lipazami lub proteazami, które wpływają ujemnie na żywotność i regenerację protoplastów. Ujemny wpływ zanieczyszczeń można zmniejszyć dodaniem węgla aktywowanego [117]; obniża to wprawdzie aktywność preparatu enzymatycznego, ale przeżywalność protoplastów jest znacznie wyższa.

c. Warunki osmotyczne w czasie inkubacji i hodowli: muszą być ściśle kontrolowane. Zbyt niskie lub zbyt wysokie ciśnienie osmotyczne powoduje nieodwracalne zmiany, pęknięcie i nietrwałość protoplastów. Stężenia i typ stabilizatora osmotycznego muszą być dobrane w zależności od obiektu czy źródła protoplastów [254, 407]. Niekiedy stosowanie mieszaniny cukrów (mannitol + sorbitol) daje lepsze efekty niż jeden stabilizator.

d. Hodowla protoplastów: regeneracja ścian po izolacji nie przedstawia na ogół większych trudności i nie wymaga egzogennych regulatorów wzrostu. W systemach fotosyntetyzujących regeneracja ścian następuje nieco szybciej. Wiek hodowli komórek, z których izoluje się protoplasty ma również związek z odtwarzaniem ścian; im starsza hodowla, tym regeneracja jest trudniejsza.

Do dalszej hodowli protoplastów stosuje się różne pożywki, najczęściej odpowiednie modyfikacje pożywek używanych w hodowli *in vitro* [31, 129, 262, 432] lub opracowane dla protoplastów [264, 292]. Częściej, szczególnie w pierwszych etapach hodowli, stosuje się pożywki płynne, rzadziej agarowe, ponieważ na tych ostatnich częstość podziałów komórek jest niższa. Do podziału i regeneracji konieczne są odpowiednie substancje wzrostowe. Ze składników pożywki istotną rolę odgrywają cukry, przy czym mieszanina różnych cukrów daje lepsze rezultaty [130, 211, 422] niż stosowanie sacharozy. O dodatnim lub ujemnym wpływie soli nieorganicznych i cukrów na stabilność protoplastów decyduje stężenie

jonów wapnia w pożywce [211]. Na przeżywalność i podziały protoplastów wpływają również światło i temperatura. U niektórych gatunków światło jest konieczne, dla innych niepożądane [239], odpowiednia intensywność światła w początkowym okresie hodowli [114] wpływa stymulująco na rozwój protoplastów. Podziały protoplastów prowadzą najczęściej do wytworzenia kolonii komórek tworzących kalus, ale w niektórych przypadkach [91, 130, 206, 326] następuje również rozwój embriogenny.

Istotną rolę w hodowli *in vitro* odgrywa koncentracja komórek. Gęstość wysiewu nie może być wysoka, ponieważ utrudnia rozwój i izolowanie kolonii, powoduje ich zrastanie, zachodzi ponadto zjawisko wzajemnego ograniczania się komórek. Z drugiej strony jednak, pojedyncze komórki dla wzrostu i podziałów mają większe wymagania pokarmowe niż agregaty komórek lub kalus. Podobna zależność występuje w przypadku protoplastów [130]. Niższa koncentracja zapewnia wprawdzie lepszy rozwój i większe rozmiary kolonii, ale obniża tempo podziałów. Protoplasty haploidalne wymagają do tworzenia kolonii wyższej gęstości wysiewu [400] w porównaniu z diploidalnymi. Konieczne jest zatem ustalenie koncentracji optymalnej. Opracowano również metodę [347, 348] zapewniającą odpowiednią częstość podziałów przy niskiej koncentracji, stosowaną poprzednio w hodowli komórek zwierzęcych. Polega ona na umieszczeniu odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny protoplastów na warstwie zatopionych w agarze protoplastów napromieniowanych. Skuteczność zabiegu badano ustalając liczbę kolonii w 1 ml pożywki. Okazało się, że w normalnej hodowli protoplasty nie dzieliły się nawet przy gęstości  $10^3$  komórek/ml. Natomiast po dodaniu protoplastów napromieniowanych udało się obniżyć minimalną gęstość konieczną do przebiegu podziałów na  $10^2$  komórek/ml. Napromieniowane protoplasty nie dzielą się, ale przypuszczalnie w jakiś sposób „odżywiają” populację protoplastów normalnych, wydzielając do pożywki aktywne substancje. Metoda ta może być wykorzystana również do innych badań wymagających niskiej gęstości wysiewu, np. przy izolacji komórek zmutowanych w przypadku zastosowania pożywki toksycznej czy w eksperymentach ze zlewaniem protoplastów.

Metody izolacji i hodowli w znacznym stopniu wpływają na funkcjonowanie i właściwości protoplastów, decydują zatem o ich przydatności do dalszych badań wymagających dużych populacji żywotnych i aktywnych metabolicznie komórek. W szeregu prac podkreśla się konieczność kontrolowania poszczególnych etapów izolacji i jej wyników oraz przeprowadzania kompleksowych badań ultrastrukturalnych, biochemicznych i fizjologicznych w celu sprawdzenia, czy warunki izolacji i hodowli nie

zmieniają właściwości protoplastów. Podstawowymi kryteriami żywotności protoplastów jest cykloza oraz wzrost liczby organelli związany z regeneracją ścian. Badania ultrastrukturalne [135, 136] wykazały, że pod wpływem izolowania następuje w protoplastach kondensacja chromatyny i hipertrofia mitochondriów. Zmiany te są jednak odwracalne i po pewnym czasie ustępują. Szereg badań dotyczy również metabolizmu kwasów nukleinowych i białek w protoplastach [128, 350, 428]. Porównując protoplasty izolowane metodą mechaniczną i enzymatyczną [322, 323] stwierdzono, że w tych ostatnich aktywność niektórych enzymów jest niższa. Okazało się również, że protoplasty mają wielokrotnie wyższą aktywność RN-azy [231] niż komórki, z których zostały wyizolowane. Gwałtowny wzrost aktywności RN-azy tłumaczy się reakcją protoplastów na szok osmotyczny i hodowlę w środowisku hipertonicznym. Istnieje więc szereg danych, że zarówno izolacja, jak i warunki hodowli indukują zmiany strukturalne i metaboliczne, ale są one odwracalne. Według niektórych autorów właśnie urazowe efekty izolacji są czynnikiem stymulującym regenerację i podziały protoplastów, wprowadzając je w stan niejako merystematyczny. Tłumaczy się to również wpływem wewnętrznego ciśnienia osmotycznego na mitozę (im niższe ciśnienie tym wyższe tempo cyklu komórkowego). Podczas regeneracji protoplastów i tworzenia kolonii [16, 17, 122-124, 265, 400, 401, 438] następują procesy odróżnicowania, przejawiające się szeregiem zmian ultrastrukturalnych. Powodują one, że protoplasty tracą cechy komórek, z których zostały wyizolowane, nabierają natomiast cech typowych dla komórek merystematycznych.

## 2. ZLEWANIE PROTOPLASTÓW

Podczas izolacji obserwowano często samorzutne zlewianie protoplastów. W większości przypadków było to związane z rozszerzaniem się plazmodesm sąsiednich komórek [444], a więc niecałkowitą izolacją. Wykazano jednak, że nawet w warunkach pełnej izolacji dochodzi do zlewania się protoplastów. Produkty takiego samorzutnego zlenia pochodzące z tej samej tkanki (homokariony) nie miałyby większego zastosowania. Okazało się jednak, że proces zlewania jest niespecyficzny i zachodzi również w mieszaninie protoplastów pochodzących z różnych tkanek czy różnych gatunków. Produkty takiego zlenia byłyby więc heterokarionami i mogłyby zostać wykorzystane do otrzymywania mieszańców somatycznych w analogiczny sposób jak w przypadku komórek zwierzęcych. Częstość samorzutnego tworzenia heterokarionów jest wprawdzie niska, ale można ją istotnie zwiększyć stosując różne czynniki stymulujące. Intensywne badania prowadzone zarówno na homo-

jak i heterokarionach pozwoliły na ustalenie przynajmniej niektórych warunków kontrolowanego zlewania i czynników odgrywających rolę w tym procesie.

**a. Warunki zlewania.** Ważnym czynnikiem jest źródło protoplastów. Protoplasty z komórek zróżnicowanych zlewają się trudniej, co związane jest z silną wakuolizacją i peryferycznym ułożeniem organelli (np. zlewanie protoplastów z liści etiolowanych zachodzi intensywniej). Najlepiej do tego celu nadawałyby się komórki merystematyczne, ale na razie niezbyt dobrze opracowane są warunki i metody ich hodowli. W przypadku protoplastów, pochodzących z kalusa lub zawiesiny komórek, istotną rolę odgrywa wiek hodowli. Podstawowym warunkiem zrania jest szybka izolacja i szybki kontakt protoplastów oraz niezbyt szybka regeneracja ścian. Trwałość zrania może zależeć od „zgodności osmotycznej” protoplastów pochodzących z różnych tkanek [335]. Na częstość zlewania mają ponadto wpływ warunki hodowli [28, 212, 220, 371], takie jak temperatura, typ i koncentracja stabilizatora osmotycznego, stężenie jonów wapnia i pH.

**b. Stymulatory zlewania.** Stosuje się różne czynniki stymulujące zarówno fizyczne, jak i chemiczne. Ich efektywność zależna jest jednak również od obiektu, stężenia stymulatora, czasu jego działania, temperatury, pH, gęstości protoplastów itd. [10, 78, 212, 423]. W charakterze stymulatorów stosowano:  $\text{NaNO}_3$  [138, 333], konkawalinę A [142, 149], lizozym [207, 328, 329], wirowanie [219], glikol polietylenowy — PEG [78, 423], żelatynę [207], przeciwciała [169], inaktywowany wirus Sendai [219] oraz szereg innych związków. Najszersze zastosowanie znalazły dotychczas  $\text{NaNO}_3$ , PEG, lizozym oraz opracowana przez Kellera i Melchersa [220] metoda stymulacji wysoką koncentracją jonów wapnia w warunkach alkalicznego pH. Stymulatory te indukują zlewanie protoplastów pochodzących z różnych tkanek i różnych gatunków. Optymalny stymulator powinien dawać małe skupiska złożone z kilku protoplastów. Zbyt silna agregacja nie jest pożądana, ponieważ utrudnia izolację i obserwacje produktów zrania, a przede wszystkim uniemożliwia otrzymanie rzeczywistych heterokarionów. Stopień agregacji można jednak w pewnym zakresie kontrolować czasem działania i stężeniem stymulatora. Czynniki stymulujące powinny być ponadto możliwie mało toksyczne, nie obniżać żywotności, tempa regeneracji ani podziałów w protoplastach. Aby indukował zlewanie protoplastów z różnych tkanek, jego działanie powinno być niezależne od ciśnienia osmotycznego komórek.

**c. Identyfikacja heterokarionów.** Ponieważ proces zlewania nie jest specyficzny, zasadniczym problemem jest odróżnienie homokarionów

(A+A i B+B) od heterokarionów (A+B) w mieszanej populacji protoplastów. W tym celu wykorzystuje się szereg cech morfologicznych i cytologicznych mogących służyć jako markery do selekcji produktów mieszańcowych. Takimi markerami mogą być: kształt i wielkość komórek, obecność lub brak chloroplastów w tkankach fotosyntetyzujących i niefotosyntetyzujących [119, 444], barwników [205, 329, 447], stopień wakuolizacji komórek merystematycznych i zróżnicowanych. Do badania częstości zlewania opracowano metodę [219] zróżnicowanego barwienia się jąder fuksyną karbolową. Ograniczona jest ona jednak tylko do gatunków dających zróżnicowaną reakcję, a ponadto wymaga utrwalania materiału.

Idealnymi markerami byłyby mutanty biochemiczne, ponieważ warunkowałyby rozwój heterokarionów na selektywnych pożywkach. Problem ten zostanie poruszony nieco później. Dobrymi markerami okazały się również mutacje chlorofilowe [138, 249] oraz różne wymagania hormonalne poszczególnych gatunków [55, 56, 59, 127].

d. Mechanizm zlewania. Badanie mechanizmu zlewania wiąże się ściśle z działaniem stymulatorów i ustalaniem ich właściwości fizykochemicznych, warunkujących wzajemne przyciąganie protoplastów. Liczne obserwacje wykazywały, że agregacja protoplastów indukowana jest w niektórych przypadkach przez związki o charakterze polikationów, w innych — polianionów. Świadczyłoby to, że ładunki elektryczne na powierzchni protoplastów odgrywają decydującą rolę we wzajemnym przyciąganiu i kontakcie protoplastów, który jest wstępnym warunkiem zlewania. Pierwotnym efektem działania stymulatorów byłaby zatem modyfikacja tych ładunków lub tworzenie „mostów” molekularnych, łączących jednakowo naładowane protoplasty. Innym czynnikiem mogłyby być zmiany strukturalne plazmalemmy. Z badań nad komórkami zwierzęcymi wynika, że przynajmniej niektóre ze stymulatorów powodują zmiany konfiguracji lipidów, co zwiększa przepuszczalność kationów i również zmienia ładunek elektryczny. Przeprowadzono szczegółowe badania [324, 358] dotyczące struktury plazmalemmy i stanu elektrycznego powierzchni protoplastów roślinnych oraz zmian tych właściwości pod wpływem czynników indukujących zlewanie. Stwierdzono, że ruchliwość elektroforetyczna protoplastów zależy od typu komórek, pH, siły jonowej, lepkości i składu pożywki [149]. Wykonano również porównawcze badania mikroelektroforetyczne w tych samych warunkach po zastosowaniu różnych koncentracji poszczególnych czynników stymulujących. Większość stymulatorów hamowała ruchliwość elektroforetyczną protoplastów w kierunku określonego bieguna. Im wyższa była koncentracja stymulatora, tym niższa ruchliwość; w krańcowych przypadkach następowała zmiana kierunku do bieguna przeciwnego. Działanie stymu-



latorów może więc polegać na modyfikacji powierzchniowego ładunku elektrycznego i osłabieniu sił odpychania między protoplastami. Jednak niektóre ze stymulatorów w koncentracji optymalnej do zmiany ładunku wpływały na protoplasty ujemnie. Istnieje zatem konieczność wyboru warunków kompromisowych. Inne badania [439] wykazały, że pod wpływem stymulatorów następuje zmiana potencjału powierzchni protoplastów, przemieszczenia jonów i zmiana warunków sterycznych. Powoduje to destabilizację molekularną plazmalemmy, a równoważona jest ona przez zlanie.

e. Zlewanie a komplementacja. Wstępnym warunkiem stabilizacji genomów u ewentualnych mieszańców otrzymanych w wyniku hybrydyzacji somatycznej jest komplementacja. Próbowano zatem zbadać, czy zachodzi ona na poziomie komórek roślinnych i wykazano [138–139], że możliwość taka istnieje. Wykorzystano w tym celu dwie jądrowe mutacje chlorofilowe (*ij* i *wd*) u kukurydzy. Jedna z nich warunkowała nietypową strukturę chloroplastów w określonych regionach liści, a druga brak syntezy chlorofilu. Zakładano, że po zlaniu protoplastów obu typów powinno nastąpić tworzenie normalnie zabarwionych heterokarionów, w wyniku wzajemnego uzupełniania się mutacji. Po połączeniu protoplastów, mutanta *ij*, pochodzących z zielonych sektorów tkanki, z protoplastami typu *wd* w białym składniku heterokarionu następowało zielenienie plastydów; obecność chlorofilu potwierdzono dodatkowo fluorescencją w ultrafiolecie. Łączenie protoplastów *ij* z białych sektorów tkanki i protoplastów typu *wd* nie dało podobnego efektu, braku komplementacji nie udało się w tym przypadku wyjaśnić. Natomiast łączenie protoplastów z liści normalnych i protoplastów *wd* powodowało fluorescencję. Ilościowe badania mikrodensytometryczne wykazały, że po upływie 48 godzin od zlania składnik *wd* zawierał 32% całkowitej fluorescencji heterokarionu. Prowadzi się również podobne badania nad możliwością uzupełniania się trzech różnych mutacji *ws*. Analogiczne metody można będzie ponadto wykorzystać do badania zależności między mutacjami cytoplazmatycznymi lub genami jądrowymi i cytoplazmatycznymi.

W tabeli 3 zestawiono próby zlewania protoplastów pochodzących z różnych tkanek i różnych gatunków. Z przedstawionych danych wynika, że możliwe jest łączenie protoplastów w różnych kombinacjach, nawet z roślin dość odległych filogenetycznie — jednoliściennych i dwuliściennych. Jednak tylko w pojedynczych przypadkach udało się doprowadzić do tworzenia kolonii, najczęściej zdolność do podziału jest w mieszańcowych produktach zahamowana. Mieszańce somatyczne otrzymano dotychczas jedynie w przypadku *Nicotiana*. Na szczególną uwagę zasłu-

TABELA 3. Zlewanie protoplastów

Lp.	Gatunki	Źródło protoplastów	Kryterium selekcji heterokarionów	Stymulator	Wyniki	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
1 a	<i>Brassica oleracea</i>	liście	zabarwienie komórek	NaNO <sub>3</sub>	złanie	205
1 b	<i>Brassica chinensis</i>	korzenie				
2 a	<i>Lilium longiflorum</i>	PMC		samorzutne	złanie	195
2 b	<i>Trillium kamschatcicum</i>	PMC				
3 a	<i>Avena sativa</i>	meryst. korz.	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	złanie	333
3 b	<i>Zea mays</i>	korz. boczne				
4 a	<i>Glycine maxima</i>	zawieszina kom.	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	złanie	137
4 b	<i>Digitaria sanguinalis</i>	liście				
5 a	<i>Torenia bailloni</i>	płatki kwiatu	zabarwienie komórek	lizozym	złanie	328, 329
5 b	<i>Torenia fournieri</i>	płatki kwiatu				
6 a	<i>Petunia hybrida</i>	płatki kwiatu	zabarwienie komórek	lizozym	złanie	329
6 b	<i>Petunia hybrida</i>	płatki kwiatu				
7 a	<i>Nemesia strumosa</i>	płatki kwiatu	zabarwienie komórek	lizozym	złanie	329
7 b	<i>Nemesia strumosa</i>	płatki kwiatu				
8 a	<i>Nicotiana sanderae</i>	liście, płatki	markery morfologiczne	lizozym	złanie w różnych kombinacjach	329
8 b	<i>Mimulus hybrida</i>	płatki kwiatu				
8 c	<i>Petunia hybrida</i>	liście				
8 d	<i>Torenia fournieri</i>	liście				
9 a	<i>Papaver rhoeas</i>	płatki kwiatu	zabarwienie komórek	samorzutne	złanie	445
9 b	<i>Papaver rhoeas</i>	płatki kwiatu				
10 a	<i>Zea mays</i>	liście mut. wd	zielone zabarwienie	NaNO <sub>3</sub>	złanie	138
10 b	<i>Zea mays</i>	liście mut. ij				
11 a	<i>Zea mays</i>	liście mut. wd	zielone zabarwienie	NaNO <sub>3</sub>	złanie	139
11 b	<i>Zea mays</i>	liście norm.				
12 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	złanie	442
12 b	<i>Lycopersicum esculentum</i>	owoc				
13 a	<i>Petunia hybrida</i>	liście 1n	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub> , lizozym	złanie	28

TABELA 3. — cd.

1	2	3	4	5	6	7
b	<i>Petunia hybrida</i>	liście 2n				
c	<i>Petunia hybrida</i>	kalus				
14 a	<i>Centaurea cyanus</i>	liście	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	złanie	90
b	<i>Pisum sativum</i>	liście				
15 a	<i>Vicia hajastana</i>	zawiesina kom.	markery morfologiczne	PEG	złanie	125, 212
b	<i>Pisum sativum</i>	liście				
16 a	<i>Glycine max</i>	zawiesina kom.	zróżnicowane	różne	złanie	219
b	<i>Triticum aestivum</i>	liście	barw. jąder			
17 a	<i>Oryza sativa</i>	liście	zróżnicowane	różne	złanie	219
b	<i>Triticum aestivum</i>	liście	barw. jąder			
18 a	<i>Glycine max</i>	zawiesina kom.		przeciwciała	agregacja	169
b	<i>Vicia hajastana</i>	zawiesina kom.				
c	<i>Bromus inermis</i>	zawiesina kom.				
19 a	<i>Secale cereale</i>	liście etiol.	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	złanie	119
b	<i>Triticum aestivum</i>	liście norm.				
20 a	<i>Daucus carota</i>	zawiesina kom.	zróżnicowane	NaNO <sub>3</sub> , PEG	złanie w różnych kom-	352
b	<i>Atropa belladonna</i>	zawiesina kom.	barw. jąder,	jony Ca w war.	binacjach	
c	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście	markery morfologiczne	wysokiego pH		
d	<i>Petunia hybrida</i>	liście				
21 a	<i>Lupinus angustifolius</i>	liście	markery morfologiczne	PEG	złanie w różnych kom-	414
b	<i>Lupinus angustifolius</i>	brodawki korz.			binacjach	
c	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście				
22 a	<i>Glycine max</i>	zawiesina kom.	zróżn. barwienie	PEG, różne	złanie, podziały	212, 219
b	<i>Vicia hajastana</i>	zawiesina kom.	markery morfologiczne		heterokarionów	
23 a	<i>Glycine max</i>	zawiesina kom.	markery morfologiczne	PEG	podziały heterokario-	212
b	<i>Hordeum vulgare</i>	liście			nów	
24 a	<i>Daucus carota</i>	zawiesina kom.	markery morfologiczne	PEG	podziały heterokario-	105
b	<i>Hordeum vulgare</i>	liście			nów	
25 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście	markery morfologiczne	NaNO <sub>3</sub>	kalus zdolny do róż-	335
b	<i>Petunia hybrida</i>	liście			nicowania	

TABELA 3. — cd.

1	2	3	4	5	6	7
26 a	<i>Petunia hybrida</i>	liście	różne wymagania hormonalne	NaNO <sub>3</sub>	mieszaneczkowy kalus	127
26 b	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	narostła	markery morfologiczne	PEG	heterokariony tworzące kolonie rośliny	213
27 a	<i>Brassica napus</i>	zawiesina kom.	zielone zabarwienie kolonii			247, 248
27 b	<i>Glycine maxima</i>	liście mut. <i>yc</i>				
28 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście mut. <i>yg</i>	zielone zabarwienie kolonii	PEG	rośliny łączące cechy obu mutantów	140, 141
28 b	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście mut. <i>Su</i>				
29 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście mut. <i>vg</i>	komplementacja mutantów	jony Ca w war. wysokiego pH	rośliny mieszańcowe	249
29 b	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście hapl.				
30 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	mut. <i>s i v</i>	różne wymagania hormonalne	NaNO <sub>3</sub>	mieszaneczkowy tunkowy zlanie	57, 59
30 b	<i>Nicotiana tabacum</i>	liście	markery morfologiczne	różne		444
31 a	<i>Nicotiana glauca</i>	liście				
31 b	<i>Nicotiana langsdorffii</i>	epiderma liści				
32 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	mięszysz liści	markery morfologiczne	różne		444
32 b	<i>Nicotiana tabacum</i>	mięszysz liści				
33 a	<i>Nicotiana tabacum</i>	mięszysz liści	markery morfologiczne	różne		444
33 b	<i>Petunia hybrida</i>	epiderma liści				

gują dwa przykłady: otrzymanie mieszańca *N. tabacum* powstałego ze zlania haploidalnych protoplastów pochodzących z mutantów chlorofilowych *s i v* [249] oraz mieszańca międzygatunkowego *N. glauca* i *Nicotiana langsdorfii* [55, 57, 59]. W pierwszym przypadku kryterium selekcji heterokarionów była synteza chlorofilu, w drugim — różne wymagania hormonalne obu gatunków. W obu przypadkach wykazano identyczność mieszańców somatycznych ( $A+B$ ) z mieszańcami otrzymanymi drogą płciową ( $A \times B$ ).

Odrębnym problemem jest zlanie jąder w heterokarionach, będące koniecznym warunkiem integracji mieszańcowych genomów. Wykazano je tylko na nielicznych przykładach. Z badań nad wielojądrowymi homokarionami [255, 334, 349, 350] wynika, że możliwość zlania jąder determinowana jest przez synchroniczne podziały zachodzące w różnych płaszczyznach i wytwarzanie wspólnych wrzecion podziałowych w warunkach zapobiegających cytokinezie.

Należy ponadto podkreślić konieczność badań ultrastrukturalnych w celu kontroli zlewania, ponieważ w mikroskopie świetlnym przyleganie protoplastów, agregacja czy zlanie dają podobny obraz i odróżnienie poszczególnych przypadków nie jest możliwe. Badania w mikroskopie elektronowym [125, 443, 444] wykazały, że następuje początkowo przyleganie plazmalemy protoplastów, a później jej zlanie i stopniowe zanikanie z jednoczesnym rozszerzaniem się obszaru ciągłości cytoplazmatycznej.

### III. ZASTOSOWANIE HODOWANYCH IN VITRO KOMÓREK SOMATYCZNYCH, GENERATYWNYCH I PROTOPLASTÓW

Formy haploidalne otrzymane z hodowli pylników mogłyby znacznie ułatwić analizę kariologiczną szeregu gatunków. Na poziomie haploidalnym łatwiejsze byłoby również odróżnienie współdziałania genów lub interakcji między różnymi loci od efektu dominacji. Formy haploidalne po podwojeniu liczby chromosomów mogą stanowić źródło różnych linii izogenicznych. Linie takie są podstawą klasycznych metod analizy genetycznej, ale ich otrzymanie z form heterozygotycznych jest trudne i czasochłonne, wymaga bowiem krzyżowania i selekcji określonych genotypów przez szereg pokoleń. Linie izogeniczne byłyby z kolei cennym źródłem komórek do analizy genetycznej metodami mikrobiologicznymi z pominięciem cyklu płciowego. Szczególne zastosowanie mogą mieć haploidy w badaniach mutacyjnych. Opracowano już pewne metody indukowania mutacji u haploidów [97, 257, 289] oraz otrzymano interesujące mutanty. Komórki somatyczne haploidów lub izolowane mikrospory można będzie wykorzystać do otrzymania linii zmutowanych, po-

nieważ każda zmiana fenotypu może się w nich ujawnić i być po diploidyzacji utrwalona w postaci linii czystych. Komórki haploidalne mogą służyć również jako materiał wyjściowy do szeregu badań biochemicznych dotyczących kontroli metabolizmu komórek roślinnych.

Protoplasty stanowią idealny model do badań biogenezy ściany komórkowej. Już obecnie prowadzi się szereg badań ultrastrukturalnych i biochemicznych [42, 47, 84, 150, 162, 251–253, 353, 440, 441], które pozwolą ustalić rolę plazmalemy i organelli cytoplazmatycznych w wytwarzaniu ścian, wyjaśnić wzajemne zależności między wytwarzaniem ścian a podziałami komórek oraz ustalić wpływ różnych czynników na te procesy.

W dalszych przykładach zastosowań komórki haploidalne, diploidalne i protoplasty zostaną omówione łącznie.

#### 1. PROBLEM MARKERÓW

Główną barierą ograniczającą analizę genetyczną na poziomie komórek roślinnych hodowanych *in vitro* była diploidalność. Obecnie w związku z możliwością otrzymywania dużych populacji komórek haploidalnych podstawowa trudność została przełamana. Pojawiły się jednak nowe problemy, przede wszystkim brak odpowiednich mutantów, oraz trudność selekcji i izolacji zmutowanych komórek. Markerami selekcji mogłyby być mutanty biochemiczne, których komórki zdolne są do wzrostu tylko na określonych pożywkach. Markery niezbędne są również do selekcji heterokarionów w zlewaniu protoplastów. W tego rodzaju badaniach istotne jest ponadto, aby mutacja wyselekcjonowana na poziomie komórek została przeniesiona na roślinę jako cecha stała. Pierwsze próby otrzymania mutantów biochemicznych z hodowanych komórek roślinnych przeprowadzono u *Nicotiana* [51, 55, 58]. Zawieszoną komórek haploidalnych poddano działaniu sulfonianu etylo - metylowego (EMS) w celu wywołania mutacji. Aby wyizolować z mieszanej populacji komórki zmutowane zastosowano następującą metodę: umieszczono całą populację w pożywce minimalnej, warunkującej wzrost i podziały tylko komórek normalnych. Do pożywki dodano BuDR, który jako analog tyminy włącza się do DNA podczas replikacji. Ponieważ komórki zmutowane nie dzieliły się, nie włączały również analogu. Został on natomiast włączony w DNA komórek normalnych. DNA zawierający BuDR ulega na świetle degradacji, w wyniku czego komórki normalne ginęły. Wyselekcjonowane w ten sposób komórki zmutowane przenoszono na różne warianty uzupełnionych pożywek i testowano wymagania pokarmowe. Po ustaleniu defektów biochemicznych kolonie komórek regenerowano w rośliny i diploidyżowano. W ten sposób otrzymano linie

auksotroficzne, niezdolne do syntezy aminokwasów, puryn itd. Podobne mutanty biochemiczne mogłyby znaleźć szerokie zastosowanie do analizy genetycznej i selekcji heterokarionów. Okazało się jednak, że otrzymane mutanty są „leaky” (nieszczelne), tzn. mają pewną zdolność do wzrostu na nieuzupełnionych pożywkach. Zjawisko to związane jest z allopoliploidalnym charakterem genomu *N. tabacum*. Jakkolwiek otrzymane z hodowli pylników rośliny są haploidalne w stosunku do genomu wyjściowego, w rzeczywistości są diploidami, a więc ich komórki mogą zawierać więcej niż jedną kopię analizowanych genów. Selekcja mieszańców somatycznych oparta na zasadzie komplementacji między otrzymanymi mutacjami nie była skuteczna, ponieważ rozwijały się nie tylko hetero - ale i homokariony. Metody te mogłyby zatem zostać wykorzystane u innych typowo diploidalnych gatunków. U większości roślin nie znajdują jednak przynajmniej na razie szerszego zastosowania również z innych względów. Testowanie braków pokarmowych wymaga bowiem stosowania całkowicie syntetycznych pożywek pozwalających na dodawanie lub usuwanie określonych składników, co nie jest osiągalne dla hodowanych komórek wielu gatunków. Poszukiwania markerów biochemicznych poszły więc innym torem, raczej w kierunku otrzymywania mutantów odpornych na antymetabolity, inhibitory syntezy czy analogi różnych związków oraz toksyny. Reakcja komórek jest w tym przypadku bardziej jednoznaczna, a kryterium selekcji jest wzrost komórek odpornych. Metoda ta polega na umieszczeniu dużej populacji komórek w pożywce zawierającej taką koncentrację inhibitora, która jest dla normalnych komórek letalna i wykrywaniu komórek zmutowanych, które w tych warunkach będą zdolne do życia. Częstość komórek odpornych można zwiększyć stosując jednocześnie czynniki indukujące mutacje. Bardzo często komórki odporne hoduje się przez pewien okres na pożywkach o coraz wyższym stężeniu inhibitora i selekcjonuje z nich linie o znacznie wyższej odporności w porównaniu z wyjściową. Otrzymane w ten sposób linie zachowują odporność przez szereg pokoleń komórkowych po usunięciu inhibitora. Odporne linie komórek są w normalny sposób izolowane i mogą być regenerowane w rośliny.

W tabeli 4 zestawiono otrzymane dotąd markery i mutanty z wykorzystaniem komórek haploidalnych, diploidalnych oraz protoplastów. Najbardziej zaawansowane prace przeprowadzono dla tytoniu i marchwi [310, 433-437]. Otrzymano w tym przypadku nie tylko różne typy mutantów, ale udało się również wyjaśnić mechanizmy warunkujące odporność komórek na działanie zastosowanych inhibitorów. Określone koncentracje 5 - metyltryptofanu (5 MT) hamują wzrost normalnych komórek u badanych gatunków, efekt inhibitora jest odwracalny po dodaniu do pożywki tryptofanu lub indolu. Wyselekcjonowano linie komórek nie

TABELA 4. Markery biochemiczne

Lp.	Gatunek	Źródło komórek	Marker	Uwagi	Literatura
1	2	3	4	5	6
1	<i>Petunia hybrida</i>	kalus $1n$	odporność na streptomycynę	Kalus odporny, ale niezdolny do różnicowania	24 25
2	<i>Nicotiana sylvestris</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	kalus $1n$ i $2n$	odporność na streptomycynę	Linie odporne zregenerowano i zdiplodizowano. Na podstawie wzrostu w pożywce zawierającej inhibitor potwierdzono odporność komórek pochodzących z otrzymanych roślin. Skrzyżowano w obu kierunkach rośliny odporne z wrażliwymi; wykazano, że cecha odporności uwarunkowana jest cytoplazmatycznie	243
3	<i>Nicotiana tabacum</i>	zawiesina komórek $2n$	odporność na treoninę	Na pożywce zawierającej azotany, po dodaniu treoniny wzrost komórek normalnych jest zahamowany. Wyizolowano linię odporną na inhibicyjne działanie treoniny. Wykazano, że pobieranie azotu z pożywki przebiega normalnie, a odporność związana jest z zahamowaniem syntezy reduktazy azotanowej	170
4	<i>Nicotiana tabacum</i>	haploidalne protoplasty i hodowane komórki z linii wrażliwej na <i>Pseudomonas tabaci</i>	odporność na sulfoximinę metioninową (SIM)	Odporność indukowano za pomocą EMS. Otrzymano linie odporne na działanie SIM, która jest analogiem toksyny bakteryjnej. Zregenerowano rośliny odporne na infekcję; charakteryzowały się one również podwyższoną zawartością metioniny	54 55 58
5	<i>Nicotiana tabacum</i>	zawiesina komórek $2n$	odporność na 8-azaguaninę i BuDR	Zastosowano koncentracje inhibitorów, które nie hamowały wzrostu, ale powodowały zahamowanie syntezy chlorofilu. Otrzymano linie komórek o normalnym zielonym zabarwieniu	236
6	<i>Nicotiana tabacum</i>	kalus $1n$	odporność na BuDR	Z otrzymanej linii odpornej zregenerowano rośliny	244
7	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek $2n$	odporność na 5-metyltryptofan (5MT)	Otrzymano różne typy zmutowanych linii. Zregenerowano rośliny; hodowane z nich komórki zachowały odporność na 5MT	433, 434 435, 436 437



TABELA 4. — cd.

1	2	3	4	5	6
8	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek $2n$	odporność na parafluorofenylalaninę	Otrzymano odporne linie komórek o zwiększonym poziomie fenyloalaniny	310 437
9	<i>Glycine maxima</i>	protoplasty z zawiesiny komórek $2n$	odporność na BuDR	Działając nitrozoguanidyną otrzymano odporną linię komórek	304
10	<i>Acer pseudo-platanus</i>	kalus $2n$	odporność na BuDR	Wyselekcjonowano odporną linię kalusa. Protoplasty wyizolowane z tej linii zachowały odporność i tworzyły kolonie na pożywce z inhibitorem	38
11	<i>Daucus carota</i>	zawiesina komórek $2n$	odporność na metyltryptofan	Otrzymano odporną linię, której komórki charakteryzowały się ponadto niezależnością od egzogennych auksyn	393

reagujące na działanie analogu. Badania wykazały, że 5MT nie zastępuje tryptofanu, hamuje natomiast syntetazę antranilową (AS) biorącą udział w syntezie tego aminokwasu. Badano aktywność enzymu z linii wrażliwych i odpornych w obecności 5MT. Stwierdzono, że aktywność enzymu z komórek odpornych hamowana była przez znacznie wyższe stężenia analogu. Wykazano również, że komórki odporne nie mają zdolności inaktywacji ani degradacji inhibitora, syntetyzują natomiast 30-krotnie więcej tryptofanu niż komórki normalne. Odporność na 5MT związana jest najprawdopodobniej ze zmianą struktury syntetazy antranilowej. Mutanty te oznaczono jako  $trp^+AS$  i zregenerowano z nich rośliny. Hodowane z otrzymanych roślin komórki były również odporne na 5MT.

Wśród linii odpornych wyselekcjonowano ponadto drugą grupę mutantów, takich, u których odporność wynikała z innych przyczyn. Znakując 5MT wykazano, że cecha ta związana była z ograniczonym pobieraniem analogu z pożywki. Ponieważ nie stwierdzono różnic w poziomie tryptofanu między tą linią a komórkami normalnymi, mutanty te określono jako permeazowe ( $trp^+P$ ). Podobnie jak w poprzednim przypadku cechą wykrytą na poziomie komórek odtworzono w roślinie i ponownie wykrywano w hodowanych komórkach. Zaindukowana odporność okazała się zatem stała.

Linie odporne otrzymano również hodując komórki *N. tabacum* i *Daucus carota* na pożywkach z PFP. W tym przypadku odporność związana była z ograniczonym pobieraniem analogu, ale wynikało ono ze zwiększonej zawartości wolnej fenyloalaniny w komórkach. Zwiększona pula normalnego metabolitu hamowała włączanie PFP.

Z przytoczonych danych wynika, że możliwe jest otrzymywanie mutantów biochemicznych zarówno regulatorowych, jak i strukturalnych, które stanowiłyby nie tylko markery, ale mogłyby służyć również do badań metabolizmu komórek roślinnych. Pewnym ograniczeniem tych możliwości jest niestabilność cytologiczna hodowanych komórek oraz brak ściśle opracowanych warunków hodowli dla wielu gatunków. Są również inne próby otrzymywania markerów i metod selekcji heterokarionów oparte na różnej reakcji komórek poszczególnych gatunków na te same związki chemiczne. Po ustaleniu, że dana substancja czy jej określona koncentracja hamuje wzrost protoplastów jednego gatunku, a nie wpływa na wzrost drugiego, dobiera się inną substancję, która w stosunku do analizowanych gatunków ma efekt odwrotny. Na pożywce zawierającej mieszaninę testowanych związków możliwy byłby wzrost tylko heterokarionów. Na razie przeprowadzono wstępne próby, oddzielnie dla dwu gatunków, które mają podobne wymagania pod względem warunków hodowli, ale się nie krzyżują. Hodowano protoplasty tytoniu i petunii [69] na pożywkach z dodatkiem aminokwasów, nukleotydów i ich analogów i przetestowano reakcję na kilkanaście związków chemicznych w różnych stężeniach. Okazało się, że przynajmniej niektóre z badanych substancji dawały przeciwstawną reakcję komórek obu gatunków. W dalszej kolejności można więc będzie umieścić mieszaninę protoplastów w pożywce zawierającej oba związki różnicujące i sprawdzić, czy metoda daje spodziewane wyniki. Dodatkową jej zaletą jest możliwość bezpośredniej selekcji, bez konieczności otrzymywania linii zmutowanych, regeneracji ich w rośliny, izolowania protoplastów i dopiero potem ich zlewania. Rozwiązałyby to szereg problemów pod warunkiem, że stymulatory zlewania nie będą wpływały modyfikująco na zróżnicowaną reakcję protoplastów, a stosowane związki różnicujące nie będą hamowały normalnego rozwoju heterokarionów.

Jeszcze innymi markerami mogłyby być gatunkowe różnice izoenzymatyczne, umożliwiające identyfikację heterokarionów metodami biochemicznymi. Kryterium selekcji stanowiłoby wykrycie w heterokarionach izoenzymów charakterystycznych dla obu gatunków. Porównanie ilości, rozmieszczenia i ruchliwości elektroforetycznej dehydrogenaz jabłczanowych u di- i haploidów *Datura metel* oraz *Datura innoxia* [132] wykazało, że układ izoenzymów jest stały niezależnie od tkanki, organu czy stadium rozwojowego, ale dla obu gatunków różny. Wykorzystanie izoenzymów w charakterze markerów wydaje się zatem celowe.

Izolowanie heterokarionów i komórek zmutowanych wymaga niskiej gęstości wysiewu i odpowiedniego rozproszenia komórek w hodowli. Istnieje więc konieczność opracowania metod zapewniających optymalne warunki izolacji. Stwierdzono, że dodanie do zawiesiny niskich stężeń

kolchicyny [408] lub enzymów degradujących ściany [223] skutecznie zapobiega agregacji komórek. Można zastosować również omawianą już metodę wysiewu o niskiej gęstości i umieszczeniu zawiesiny komórek na warstwie agaru zawierającej komórki napromieniowane.

## 2. WYKORZYSTANIE HETEROKARIONÓW

Heterokariony powstałe ze zlewania protoplastów mogłyby służyć do otrzymywania mieszańców międzygatunkowych, łączących zarówno materiał jądrowy, jak i cytoplazmatyczny obu gatunków. Hybrydyzacja somatyczna umożliwiającą pominięcie barier istniejących między gatunkami miałaby u roślin rozległe perspektywy wykorzystania. Dotychczas jednak otrzymano mieszańce somatyczne tylko w przypadku *Nicotiana*, obiektu znanego z wysokich zdolności morfogenetycznych *in vitro*, i to u gatunków krzyżujących się ze sobą. U pozostałych gatunków udaje się jedynie otrzymać heterokariony rzadko zdolne do tworzenia kolonii lub organogenezy. Szereg badań wskazuje ponadto, że protoplasty po zlaniu rozwijają się słabiej oraz że inicjacja podziałów w homokarionach jest w porównaniu z heterokarionami znacznie łatwiejsza. Jedną z prób przezwyciężenia tych trudności jest metoda synchronizacji komórek jednego gatunku przed zlaniem protoplastów [105] zastosowana w heterokarionach marchew-jęczmień. Przed izolacją protoplastów zawiesinę komórek marchwi synchronizowano działaniem niskiej temperatury i warunków beztlenowych. Po osiągnięciu wysokiego wskaźnika podziałów z komórek izolowano protoplasty i łączono je z protoplastami jęczmienia. Stwierdzono, że wzrost aktywności mitotycznej komórek jednego gatunku w istotny sposób wpływał na zwiększenie częstości podziałów w heterokarionach oraz indukował mitozy w nie dzielących się protoplastach drugiego gatunku. Na obecnym etapie badań postuluje się również tworzenie takich heterokarionów, w których przynajmniej jeden ze składników ma dobrze opracowane warunki hodowli *in vitro*. Z tych też względów w wielu kombinacjach mieszańcowych z innymi gatunkami łączone są komórki marchwi, soi i tytoniu. W kierunku zwiększenia możliwości hybrydyzacji somatycznej zmiierzają ponadto prace dotyczące izolowania protoplastów z tetrad i młodych ziaren pyłku [6-9, 32, 341, 342]. Wstępne badania wykazały, że protoplasty te mają zdolność regeneracji ścian, podziałów oraz zlewania się. Według niektórych sugestii tworzenie mieszańców somatycznych przez zlanie haploidalnych, zdeteminowanych jako generatywne komórek mogłoby być łatwiejsze i proces ten ściślej odpowiadałby zapłodnieniu.

Na razie trudno jednak przewidzieć, czy otrzymanie mieszańców somatycznych u roślin okaże się realne, szczególnie w przypadku ga-

tunków odległych filogenetycznie. U zwierząt udaje się otrzymać żywotne przez pewien okres heterokariony odległych gatunków. Takie mieszańcowe połączenia komórek, np. gryzoni i człowieka, mają pewne interesujące właściwości [366, 373]. Mianowicie, w heterokarionach następuje stopniowa i wybiórcza eliminacja chromosomów jednego gatunku. Zjawisko to tłumaczy się faktem, że cykl spiralizacji chromosomów każdej z komórek wchodzących w skład heterokarionu może być różny. Chromosomy, których kondensacja następuje wcześniej, nie biorą udziału w mitozie i zostają eliminowane\*. Zanim dojdzie jednak do pełnej eliminacji, możliwe jest wykorzystanie heterokarionów o pełnym zespole chromosomów jednego gatunku w połączeniu z różnymi kombinacjami poszczególnych chromosomów drugiego gatunku. Pozostający w mieszańcu aneuploidalny genom drugiego gatunku jest funkcjonalny, może więc służyć do ustalania lokalizacji genów w chromosomach. Jeżeli na przykład genom gatunku, którego chromosomy nie są eliminowane, nie ma pewnej funkcji, która występuje w heterokarionie i łączy się z obecnością chromosomu lub chromosomów drugiego gatunku, można przyjąć, że geny warunkujące tę cechę znajdują się w genomie drugim. Obecnie stosowane metody cytologicznej identyfikacji chromosomów zwierzęcych (fluorescencja i barwienie Giemsa) umożliwiają jednoznaczne skorelowanie analizowanej funkcji z określonym chromosomem. Za pomocą tych samych metod można nie tylko mapować poszczególne geny, ale ustalać również związki między grupami cech i badań sprzężenia genów. Jeżeli dwa geny są sprzężone, ich jednoczesna ekspresja w liniach mieszańcowych niezależnego pochodzenia powinna być wzajemnie zgodna. Natomiast zbieżność ekspresji obu cech z obecnością określonego chromosomu wskazuje na sprzężenie genów z tym właśnie chromosomem. Kontrolę stanowiłby oczywiście brak danej funkcji związany z eliminacją tego chromosomu w innych liniach mieszańcowych. Fluorometryczne pomiary chromosomów umożliwiają z kolei lokalizowanie genów w określonych regionach chromosomu i ścisłą korelację map genetycznych z cytologicznymi. W tym przypadku konieczne jest włączenie do eksperymentów hybrydyzacyjnych komórek z określonymi aberracjami chromosomowymi, szczególnie typu translokacji. Dla komórek zwierzęcych opracowano ponadto skuteczne metody selekcji heterokarionów. Jedną z nich jest tzw. system HAT. Markerami tego systemu jest brak kinazy tymidynowej (TK), warunkujący niezdolność wykorzystywania tyminy, oraz brak fosforybozyltransferazy hipoksantyno - guaninowej (HGPRT), warunkujący niezdolność do wykorzystania hipoksantyny. Pierwszy z markerów indukowany jest przez hodowlę komórek na pożywkach

\* Jako jedną z przyczyn eliminacji sugeruje się obecność enzymów restrykcyjnych.

z BuDR, drugi — z 8 - azaguaniną. Brak wymienionych enzymów powoduje odporność komórek na działanie tych związków, a mieszańce selekcyjonowane są na podstawie komplementacji.

Dzięki tym metodom w genetyce komórek somatycznych u zwierząt osiągnięto znaczne postępy [228]. Gdyby okazało się, że w heterokarionach roślinnych występują podobne zjawiska, możliwa byłaby analiza genetyczna tymi samymi metodami. Istnieją nawet pewne dane wskazujące na taką możliwość. W wyniku zlewania protoplastów *Petunia* i *Parthenocissus* [127] na podstawie różnych wymagań hormonalnych obu gatunków wyselekcjonowano zdolne do podziałów heterokariony. Mieszańcowość otrzymanego kalusa potwierdzono za pomocą analizy izoenzymów. Charakterystyczny dla obu gatunków układ izoenzymatyczny był przez pewien okres zachowany, ale po roku hodowli prążki charakterystyczne dla izoenzymów *Petunia* stopniowo zanikały. Analiza cytologiczna wykazała, że komórki kalusa nie zawierały chromosomów tego gatunku. Otrzymano wyniki można interpretować w różny sposób. Być może rozwijający się kalus nie był mieszańcowy pod względem genetycznym, zawierał tylko jakieś składniki enzymatyczne petunii, które ujawniały się w analizie chemicznej. Nie można jednak również wykluczyć możliwości somatycznej eliminacji chromosomów, analogicznej jaka ma miejsce w heterokarionach zwierzęcych. Zjawiska warunkujące tę eliminację uniemożliwiałyby integrację mieszańcowych genomów, a więc szanse otrzymywania mieszańców międzygatunkowych u roślin byłyby tym samym ograniczone. Istniałaby jednak możliwość wykorzystania heterokarionów w genetyce komórek somatycznych. Należy jednocześnie podkreślić, że przeprowadza się w tym kierunku szereg badań przygotowawczych, m. in. próby identyfikacji chromosomów roślinnych z zastosowaniem metod zróżnicowanego barwienia i wykorzystaniem protoplastów do analizy kariologicznej [261, 365]. Otrzymywanie niektórych markerów (tab. 4) zmierza również do opracowania systemów selekcji heterokarionów analogicznych do systemu HAT. Przeprowadzono ponadto porównania aktywności niektórych enzymów w hodowanych tkankach diploidów i trisomików *Datura* [53] w celu zbadania, czy aktywność enzymatyczna może być wskaźnikiem obecności określonych chromosomów i ewentualnej lokalizacji genów.

Analiza genetyczna nie wyczerpuje bynajmniej wszystkich możliwości wykorzystania heterokarionów. Mieszańce somatyczne stanowiłyby odpowiedni model do badania wzajemnego wpływu komórek o różnych cechach jądrowych i cytoplazmatycznych, różnej aktywności metabolicznej, czy znajdujących się w różnych stadiach różnicowania. Połączenie komórki syntetyzującej DNA z komórką, w której ta synteza nie zachodzi pozwoliłoby na sprawdzenie, czy w heterokarionie następowałyby

synteza DNA przez jądro pierwotnie nieaktywne, co obserwuje się w heterokarionach zwierzęcych. Analogiczne zlanie komórek pochodzących z dwu różnych gatunków mogłoby też wyjaśnić, czy jest to reakcja gatunkowo specyficzna. Interesujące byłoby również, jaką reakcją dałoby połączenie dwu komórek nie syntetyzujących DNA. W podobny sposób można by sprawdzić, czy RNA syntetyzowany przez jedną komórkę wchodzącą w skład heterokarionu warunkowałaby syntezę białek w komórce drugiej. Możliwe byłoby też badanie interakcji jądro - cytoplazmatycznych w przypadku łączenia komórek mutantów jądrowych i cytoplazmatycznych tych samych lub różnych gatunków. Jeżeli okazałyby się skuteczne metody oddzielenia wpływu jądra od cytoplazmy w heterokarionach, opracowane dla komórek zwierzęcych [372], można byłoby ustalić, jakie czynniki, jądrowe czy cytoplazmatyczne, kontrolują ekspresję genów różnych składników heterokarionu oraz badać zmiany aktywności i ekspresji genów po połączeniu komórek. W tego rodzaju eksperymentach konieczne są oczywiście specyficzne markery genetyczne lub biochemiczne, dające gwarancję, że dany produkt syntetyzowany jest tylko przez komórkę określonego gatunku lub tkanki.

Łączenie komórek znajdujących się w różnych etapach cyklu komórkowego pozwoliłoby na badanie kontroli procesów mitozy i mejozy. Badania dotyczące cyklu komórkowego są znacznie zaawansowane w komórkach zwierzęcych [256], natomiast u roślin wyższych nie były dotąd przeprowadzane ze względu na brak odpowiedniego systemu eksperymentalnego. Połączenie protoplastów z komórek w różnych fazach cyklu komórkowego pozwoliłoby ustalić, czy w heterokarionie nastąpi ich synchronizacja. Jeżeli okazałoby się, że tak, w dalszych etapach możliwe byłoby sprawdzenie, czy różne kombinacje faz dają te same wyniki. Ciekawe byłoby również wyjaśnienie kwestii, czy zlanie komórek w fazie S i  $G_1$  indukuje wcześniejszą syntezę DNA komórki z fazy  $G_1$  w porównaniu z synchronizowaną populacją tych samych komórek. Jeżeli takie heterokariony rozpoczynałyby podziały wcześniej niż produkty zlania, w których obie komórki były w jednakowych fazach cyklu, można byłoby wykorzystać te fakty pod kątem usprawnienia metod otrzymywania mieszańców somatycznych. Do badań tych konieczne jest opracowanie odpowiednich metod synchronizacji hodowanych komórek roślinnych, które są na razie ograniczone do niewielu gatunków [79, 144, 224, 260]. Najbliższe lata mogą dać odpowiedź na pytanie, w jakim kierunku i o ile posuną się badania dotyczące somatycznych komórek roślin wyższych. Istnieją szanse, że przynajmniej niektóre z przykładowo wymienionych zastosowań heterokarionów pozwolą wyjaśnić szereg problemów, których rozwiązanie innymi metodami nie byłoby w ogóle możliwe.

## 3. BADANIA WIRUSOLOGICZNE

Dotąd nie wspomniano o jeszcze jednej interesującej właściwości protoplastów roślinnych, jaką jest zdolność pobierania różnych cząstek, m. in. wirusów. Zainteresowano się zatem możliwością wykorzystania protoplastów w badaniach dotyczących mechanizmu infekcji wirusowej i charakteru odporności. Ponieważ badania wirusologiczne wymagają wydajnych, synchronicznych i powtarzalnych metod, protoplasty miałyby dużą przewagę nad dostępnymi dotychczas systemami eksperymentalnymi. Ze względu na brak ścian komórkowych infekcja byłaby efektywniejsza, a jednoczesne zakażenie dużych populacji protoplastów dałoby wysoki stopień synchronizacji, umożliwiając pobieranie prób w określonych odstępach czasu i badanie kolejnych stadiów replikacji wirusa.

Badania wirusologiczne na poziomie komórek roślinnych mogłyby przyczynić się również do wyjaśnienia specyficzności infekcji w stosunku do określonych gatunków i tkanek oraz mechanizmów warunkujących odporność. Istotne byłoby np. ustalenie, czy w komórkach odpornych zahamowane jest wnikanie cząstek wirusa, zablokowana jego replikacja, czy też informacja genetyczna, jaką wnosi wirus, jest przetwarzana w inny sposób niż w komórkach wrażliwych.

Dotychczasowe badania koncentrują się głównie na systemie wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) - protoplasty tytoniu. Opracowano skuteczne metody zakażania protoplastów i ilościowego oznaczania cząstek wirusa w protoplastach za pomocą fluorescencji i metod serologicznych [4, 398]. Porównanie wyników infekcji *in vivo* i *in vitro* [83] potwierdziło wyższą wydajność zakażania protoplastów. Przeprowadza się również szereg porównań między protoplastami zainfekowanymi, niezainfekowanymi oraz pochodzącymi z tkanek zainfekowanych *in vivo*. Zastosowano ponadto metody biochemiczne z wykorzystaniem inhibitorów i znakowanych prekursorów [336, 360, 398] w celu badania replikacji kwasów nukleinowych i syntezy białek wirusa. Wiele prac dotyczy również zmian ultrastrukturalnych komórek w początkowych stadiach infekcji wirusowej [43-46, 65].

Badania specyficzności procesu infekcji [45, 46, 189, 307, 360, 446] wykazały, że wirusy niespecyficzne dla pewnych gatunków mają zdolność namnażania się w ich protoplastach. Porównanie ekspresji genów wirusowych przy zakażeniu *in vivo* i *in vitro* [41, 120] wykazało, że pewne objawy odporności czy wrażliwości na infekcję występujące *in vivo* nie pojawiają się w protoplastach. Mogłoby to wskazywać, że określona ekspresja cech wirusa wynika z wzajemnych interakcji między komórkami i w izolowanych komórkach jest inna. Nie wykluczone również, że warunki hodowli protoplastów zmieniają fenotypową ekspresję

cech wirusa i dają inną reakcję niż w tkance. Szereg problemów pozostaje zatem do wyjaśnienia.

Próby analogicznych badań na protoplastach przeprowadza się w przypadku infekcji bakteryjnych i grzybowych. Ich przykładami mogą być prace dotyczące odporności tytoniu na *Pseudomonas tabaci* [54, 55, 58] oraz kukurydzy na *Helminthosporium maydis* [315].

#### 4. MODYFIKACJA KOMÓREK ROŚLINNYCH

W związku z możliwością pobierania cząstek przez protoplasty, przewiduje się próby szeroko pojętej modyfikacji funkcjonalnej i genetycznej komórek roślinnych przez wprowadzanie mitochondriów, chloroplastów, jąder, mikroorganizmów i DNA. Ponieważ pobieranie przez protoplasty stymulowane jest przez te same czynniki co zlewanie, przypuszcza się, że mechanizm obu procesów jest podobny.

W tabeli 5 zestawiono dotychczasowe próby wprowadzania do wnętrza komórek różnego rodzaju cząstek. Prace te mają charakter wstępny i ograniczają się tylko do udokumentowania pobrania obcego materiału przez protoplasty. Ich celem jest badanie funkcjonowania organelli różnego pochodzenia w komórkach roślinnych oraz możliwości utworzenia *in vitro* endosymbiotycznych połączeń między komórkami roślinnymi i mikroorganizmami.

Najbardziej interesujące projekty dotyczą modyfikacji genetycznej roślin opartej o zjawiska analogiczne do transformacji i transdukcji występującej u organizmów prokariotycznych. Procesy te polegają na przenoszeniu genów z jednej komórki do drugiej i uzyskaniu przez komórkę biorcy cech charakterystycznych dla dawcy. U organizmów wyższych proponuje się nazwanie tego zjawiska transgenozą, ponieważ transformacja oznacza określone procesy specyficzne dla komórek bakteryjnych o znanym mechanizmie. Transgenozą *in vitro* polegałaby na wprowadzaniu DNA różnego pochodzenia do komórek roślinnych i dotyczyłaby form znacznie odleglejszych filogenetycznie. Kolejne etapy transgenozy obejmowałyby pobranie egzogenego DNA, jego ewentualną integrację, transkrypcję, translację i ekspresję w komórkach biorcy.

Należy na wstępie podkreślić, że znane są dwa naturalne systemy interakcji między komórkami bakterii a roślinami wyższymi. Jeden z nich ma charakter patogenny i polega na indukcji nietypowego różnicowania komórek roślinnych przejawiającego się tworzeniem narośli pod wpływem *Agrobacterium tumefaciens*. Drugi system interakcji związany jest z symbiotycznym wiązaniem azotu przez brodawki korzeniowe roślin motylkowych pod wpływem zakażenia *Rhizobium leguminosarum*. Oba systemy są przedmiotem intensywnych badań mających na celu



TABELA 5. Pobieranie przez protoplasty

	Źródło protoplastów	Pobrane cząstki	Uwagi	Litera- tura
Białka	<i>Petunia hybrida</i> (liście)	Serum albuminowe wo- łu znakowane fluores- ceiną	Pobieranie stymulowane przez poly-L-ornitynę	177
	<i>Petunia hybrida</i> (kielekujący pyłek)	Serum albuminowe wo- łu znakowane fluores- ceiną	Obecność białka wewnątrz ko- mórek wykrywano na podsta- wie fluorescencji	179
	<i>Nicotiana tabacum</i> (liście)	Ferrytyny ze śledziony konia		332
Mikroorganizmy	<i>Pisum sativum</i> (korzenie i liście)	Rhizobium legumino- sarum	Obecność bakterii wewnątrz protoplastów wykazano w mi- kroskopie elektronowym	88
	<i>Parthenocissus tri- cuspidata</i> (narośla)	Komórki i protoplasty <i>Saccharomyces</i> , komór- ki sinic ( <i>Anacystis ni- dulans</i> )	Pobieranie stymulowane przez PEG	93
Chloroplasty	<i>Nicotiana tabacum</i> (liście mutanta <i>vg</i> )	Chloroplasty normalne	Wykazano pobranie chloro- plastów i ich zdolność do fun- kcjonowania. Otrzymano nor- malnie zabarwione rośliny	55 56
	<i>Petunia hybrida</i> (liście mutanta <i>vg</i> )	Chloroplasty normalne	Nastąpiło pobranie chloropla- stów, roślin nie udało się zregene- rować	331
	<i>Daucus carota</i> (zawieszina komórek)	Chloroplasty z glonów ( <i>Vaucheria dichotoma</i> )	Wykrywano chloroplasty wew- nątrz komórek	34
Jądra	<i>Petunia hybrida</i> <i>Nicotiana glauca</i> <i>Zea mays</i>	Jądra <i>Petunia hybrida</i>	Wykazano pobieranie jąder barwionych etylodwubromia- nem przez protoplasty z liści różnych gatunków	330

sprawdzenie w jakim stopniu tworzenie narośli i brodawek związane jest z informacją genetyczną dostarczoną przez komórki bakterii.

Istnieje również możliwość eksperymentalnej transgenozy całych roślin *in vivo*. Na przykładzie kilku gatunków [18, 173, 174, 176, 232–235] wykazano, że egzogeny, bakteryjny lub roślinny DNA może zostać pobrany przez korzenie siewek i nasion roślin wyższych, a obecność jego przejawia się fenotypowo również w dalszych pokoleniach. Wyniki te są jednak trudne do zinterpretowania, ponieważ obserwuje się w tym przypadku tylko początkowy i końcowy etap transgenozy, tzn. pobranie obcego DNA i jego ekspresję. Natomiast wszystkie pośrednie etapy są trudne do wyjaśnienia ze względu na kompleksowość organizmu roślinnego.

Wykorzystano zatem możliwość transgenozy również *in vitro*. Najbardziej interesujące wyniki uzyskano na systemie haploidalny kalus pomidora jako biorca + fagi transdukujące  $\lambda$  i  $\varphi$  80 jako dawca [102–104]. Kalus pomidora charakteryzował się brakiem zdolności wzrostu na pożywkach zawierających laktozę lub galaktozę. Wykorzystano tę cechę dla prób przeniesienia określonych genów *E. coli*, warunkujących rozkład wymienionych cukrów na prostsze metabolity dostępne dla komórek roślinnych. Inkubacja kalusa z określonymi typami fagów  $\lambda$  i  $\varphi$  80 przenoszącymi operony *lac* i *gal* spowodowała, że uzyskał on zdolność wzrostu. W odpowiednich eksperymentach kontrolnych wykluczono możliwość ewentualnych zanieczyszczeń molekularnych lub bakteryjnych. Jakkolwiek sam wzrost komórek w warunkach pierwotnie letalnych świadczyłby o wykorzystaniu obcej informacji genetycznej, autorzy za pomocą metod biochemicznych i immunogenetycznych uzyskali dowody identyczności produktu operonu bakteryjnego i enzymów wytwarzanych przez kalus po wprowadzeniu określonej informacji. Wykorzystano ponadto również zmutowane szczepy fagów w celu pełniejszego udokumentowania wyciągniętych wniosków. Prace te są przykładem doskonale opracowanego eksperymentu, w którym założono określone możliwości i otrzymano przewidywane wyniki.

Inne próby wprowadzenia obcej informacji genetycznej do komórek roślinnych, przeprowadzone na hodowanych komórkach i protoplastach, zestawiono w tabeli 6. W niektórych wykazano pobranie, w innych badano możliwość integracji, jeszcze w innych obserwowano ekspresję egzogenego DNA. Jakkolwiek interpretacja tych wyników nie jest pełna i podłoże molekularne nie wyjaśnione, na podstawie powyższego przeglądu można wyciągnąć pewne wnioski. Stan haploidalny komórek roślinnych nie jest niezbędnym warunkiem transgenozy, ponieważ ekspresję obcych genów wykrywa się również w komórkach diploidalnych. Niekonieczna jest również specyficzność biorcy, mogą to być komórki lub protoplasty różnych gatunków. Transgenozą nie wymaga też określonego dawcy, ponieważ mogą nim być zarówno cząsteczki fagów, bakterii, jak i izolowany DNA różnego pochodzenia. Wydaje się jednak, że najodpowiedniejszym systemem umożliwiającym właściwą interpretację wyników byłyby haploidalne protoplasty w połączeniu z bakteriofagami. Wykorzystując protoplasty w charakterze biorcy można byłoby uniknąć nadmiernej adsorpcji DNA, która ma miejsce na ścianach komórek, oraz pewnej jego degradacji jeszcze przed wprowadzeniem, powodowanej przez enzymy nukleolityczne, obecne na powierzchni ścian komórkowych. Istotny jest ponadto poziom i aktywność DN-azy w komórkach biorcy, który może przesądzać o dalszych losach pobranego DNA. Porównując aktywność DN-azy w hodowanych komórkach i protoplastach

TABELA 6. Transgenozza in vitro

Lp.	Biorca	Dawca	Uwagi	Litera- tura
1	Protoplasty aukso- troficznego mutantu <i>Nicotiana tabacum</i>	DNA formy nor- malnej <i>N. tabacum</i>	Autoradiograficznie potwierdzono pobranie DNA; nie uzyskano wzro- stu komórek na nieuzupełnionej po- żywce	52
2	Zawiesina diploidal- nych komórek <i>Nico- tiana tabacum</i>	DNA <i>Agrobacte- rium tumefaciens</i>	Z komórek, które pobrały podwójnie znakowany DNA wyizolowano pro- toplasty. Uzyskano pewne dane świad- czące o integracji wprowadzonego DNA	178
3	Protoplasty <i>Daucus carota</i> , <i>Glycine ma- xima</i> i <i>Ammi visnaga</i>	DNA <i>Escherichia coli</i>	Wykazano pobranie i replikację eg- zogenego DNA w protoplastach	300 301 303
4	Haploidalne proto- plasty <i>Hordeum vulgare</i>	Bakteriofag T <sub>3</sub>	W protoplastach wykryto aktywność enzymów specyficznych dla bakterio- faga	55
5	Diploidalny kalus <i>Acer pseudoplatanus</i>	Fag $\lambda$ p lac	Kalus uzyskał zdolność wykorzysta- nia laktozy, wykryto w nim obecność $\beta$ -galaktozydazy. Cecha ta utrzymy- wała się w szeregu pokoleń komórko- wych	199
6	Protoplasty biało- kwitnącego mutantu <i>Petunia hybrida</i>	DNA normalnej formy <i>P. hybrida</i> , o czerwonej barwie kwiatów	Komórki, które pobrały DNA zrege- nerowano w rośliny. Wykazywały one cechy genotypu, który był dawcą	178 184 185
7	Kielkujący pyłek <i>Petunia hybrida</i>	Fagi $\lambda$ i $\phi$ 80, DNA <i>Escherichia coli</i>	Wykazano pobranie fagów i bakte- ryjnego DNA za pomocą fluorescencji i autoradiografii	179 180
8	Kielkujący pyłek <i>Nicotiana glauca</i>	DNA <i>Rhizobium leguminosarum</i>	W komórkach wykrywano bakteryjny DNA	180

u *Glycine maxima* [187, 188] wykazano, że w świeżo izolowanych protoplastach jest ona niższa. Stwierdzono również, że aktywność DN-azy hamowana jest przez dekstran DEAE, 5'AMP i siarczan protaminy. Istnieje zatem możliwość ewentualnego zastosowania tych związków w zapobieganiu degradacji egzogenego DNA. W eksperymentach związanych z transgenozą duże znaczenie może mieć także odpowiednio wysoka aktywność matrycowa jąder w protoplastach [30]. Odpowiednim dawcą byłyby z kolei całe cząsteczki fagów, ponieważ w szeregu badań wykazano, że DNA „uwolniony” z fagów czy bakterii w naturalny sposób wewnątrz komórek jest aktywniejszy biologicznie niż oczyszczone preparaty DNA, które często w ogóle nie były skuteczne. Zdolność fa-

gów do cyrkularyzacji genomu mogłaby stanowić również pewne zabezpieczenie przed degradacją wprowadzonej informacji wewnątrz komórek biorcy. Wykorzystanie niektórych bakteriofagów dawałoby ponadto możliwość wybiórczego przenoszenia genów o określonych funkcjach. Nie wyklucza się też możliwości wbudowywania obcego materiału genetycznego w genom roślinny za pośrednictwem bakterii patogennych i symbiotycznych.

Teoretycznie istnieje możliwość eksperymentów z pogranicza inżynierii genetycznej u roślin wyższych, ale jest to cel dalekosiężny i trudny do realizacji. Dotychczasowe wyniki transgenozy należy traktować zatem jedynie jako próby badania wpływu egzogenego materiału genetycznego na komórki roślinne w sposób kierunkowy i kontrolowany.

#### LITERATURA

- [1] ABO EL - NIL M. M., HILDEBRANDT A. C., Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus, *Plant Dis. Rep.*, **55**: 1017-1020, 1971.
- [2] — Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants, *Can. J. Bot.*, **51**: 2107-2109, 1973.
- [3] AMBID Ch., DELMESTRE M. H., FALLOT J., Isolement et survie de protoplastes issus de tubercules de topinambour *Helianthus tuberosus* L., *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D* **279**: 1429-1432, 1974.
- [4] AOKI S., TAKEBE I., Replication of TMV - RNA in tobacco mesophyll protoplasts inoculated in vitro, *Virology*, **65**: 343-354, 1975.
- [5] ATANASOW A., Izolirwanyje kultury pylnikow tabaka i sacharnoj swiekły kak sriedstwo połuczenia gaploidnych rastienij i gieterogennowo po płoidnosti kallusa, *Genet. i Selekcija (bułg.)*, **6**: 501-507, 1973.
- [6] BAJAJ Y. P. S., Isolation and culture studies on pollen tetrad and pollen mother - cell protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 93-99, 1974.
- [7] — Induction of repeated cell division in isolated pollen mother cells of *Atropa belladonna*, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 309-312, 1974.
- [8] — Formation of additional microspores in isolated tetrads of *Atropa belladonna* grown in microcultures, *Z. Pflanzenphysiol.*, **75**: 464-466, 1975.
- [9] BAJAJ Y. P. S., DAVEY M. R., The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts, [w] *Fertilization in Higher Plants*, red. H. C. Linskens, North Holland, Amsterdam 1974, 73-80.
- [10] BAJAJ Y. P. S., REINERT J., GOSCH G., Differential sensivity of protoplasts of various origin to polyethylene glycol (PEG), *IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts*, Nottingham 1975, 78.
- [11] BALDEV R., HERR J. M., Dynamics of protoplasts release in solanaceous berries, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 85-91.
- [12] BAN Y., KOKUBU T., MIYAJI Y., Production of haploid plant by anther culture of *Setaria italica*, *Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, **21**: 77-81, 1971.
- [13] BAWA S. B., TORREY J. G., Budding and nuclear division in cultured protoplasts of corn, *Convolvulus* and onion, *Bot. Gaz.*, **132**: 240-245, 1971.

- [14] BAYLISS M. W., Origin of chromosome number variation in cultured plant cells, *Nature*, **246**: 529–530, 1973.
- [15] BEASLEY C. A., TING J. P., LINKINS A. E., BIRNBAUM E. H., Cotton ovule culture: a review of progress and a preview of potential, [w] *Tissue Culture and Plant Science*, red. H. E. Street, Academic Press, London 1974, 169–192.
- [16] BENBADIS A., Aspects ultrastructuraux et culture in vitro de protoplastes de mésophylle de tabac (*N. tabacum* L.), C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, **273**: 797–800, 1971.
- [17] BENBADIS A., BAUMANN F., Etude comparative de protoplastes obtenus par traitement enzymatique à partir de divers tissus: étude ultrastructurale et culture in vitro, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 189–205.
- [18] BENDICH A. J., FILNER P., Uptake of exogenous DNA by pea seedlings and tobacco cells, *Mutation Res.*, **13**: 199–244, 1971.
- [19] BENNETT M. D., HUGHES W. G., Additional mitosis in wheat pollen induced by Ethrel, *Nature*, **240**: 566–568, 1972.
- [20] BERNARD S., Development d'embryons haploïdes d'anthères cultivées in vitro. Etude cytologique comparée chez le tabac et le petunia, *Rev. Cyt. Biol. Veget.*, **34**: 165–168, 1971.
- [21] BERVILLE A., PELLETIER G., ILAMI M., Mise en évidence de propriétés particulières de tissus de *Petunia (Petunia hybrida)* male sterile cytoplasmique en culture in vitro, C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, **273**: 2512–2514, 1971.
- [22] BHOJWANI S. S., COCKING E. C., Isolation of protoplasts from pollen tetrads, *Nature, New Biol.*, **239**: 29–30, 1972.
- [23] BHOJWANI S. S., DUNWELL J. M., SUNDERLAND N., Nucleic acid and protein contents of embryogenic tobacco pollen, *J. Exp. Bot.*, **24**: 863–871, 1973.
- [24] BINDING H., BINDING K., STRAUB J., Selektion in Gewebekulturen mit haploïden Zellen, *Naturwiss.*, **57**: 138–139, 1970.
- [25] BINDING H., Selektion in Kalluskulturen mit haploïden Zellen, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **67**: 33–38, 1972.
- [26] — Nuclear and cell divisions in isolated pollen of *Petunia hybrida* in agar suspension cultures, *Nature*, **237**: 283–285, 1972.
- [27] — Cell cluster formation by leaf protoplasts from axenic cultures of haploid *Petunia hybrida*, *Plant Sci. Lett.*, **2**: 185–188, 1974.
- [28] — Fusionsversuche mit isolierten Protoplasten von *Petunia*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **72**: 422–426, 1974.
- [29] — Regeneration von haploïden und diploïden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**: 327–336, 1974.
- [30] BLASCHEK W., HESS D., HOFFMANN F., Transkription in aus Protoplasten isolierten Zellkernen von *Nicotiana* und *Petunia*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **72**: 262–271, 1974.
- [31] BLAYDES D. F., Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissues, *Physiol. Plant.*, **19**: 748–753, 1966.
- [32] BOGERS R. J., The use of protoplasts for the study of root nodule symbiosis in *Pisum sativum*, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 397–407.

- [33] BONGA J. M., MacINNIS A. H., Stimulation of callus development from immature pollen of *Pinus resinosa* by centrifugation, *Plant Sci. Lett.*, **4**: 199-203, 1975.
- [34] BONNETT H. T., ERIKSSON T., Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of higher plants, *Planta*, **120**: 71-79, 1974.
- [35] BOULWARE M. A., CAMPER N. D., Effects of selected herbicides on plant protoplasts, *Physiol. Plant.*, **26**: 313-317, 1972.
- [36] BOURGIN J. P., NITSCH J. P., Obtention de *Nicotiana* haploïdes des à partir d'étamines cultivées in vitro, *Ann. Physiol. Veg.*, **9**: 377-382, 1967.
- [37] BOURGIN J. P., CHUPEAU Y., MISSONIER C., MOREL G., Fusion de protoplastes de tabac, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 429-435.
- [38] BRIGHT S. W. J., NORTHCOTE D. H., Protoplast regeneration from normal and bromodeoxyuridine-resistant sycamore callus, *J. Cell Sci.*, **16**: 445-463, 1974.
- [39] BUI-DANG-HA D., MACKENZIE I. A., The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation, *Protoplasma*, **78**: 215-221, 1973.
- [40] BUI-DANG-HA D., NOREEL B., MASSET A., Regeneration of *Asparagus officinalis* through callus cultures derived from protoplasts, *J. Exp. Bot.*, **26**: 263-267, 1975.
- [41] BURGESS J., Towards novel plants, *New Sci.*, **64**: 242-244, 1974.
- [42] BURGESS J., FLEMING E. N., Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts, *J. Cell Sci.*, **14**: 439-447, 1974.
- [43] BURGESS J., MOTOYOSHI F., FLEMING E. N., Effect of poly-L-ornithine on isolated tobacco mesophyll protoplasts: evidence against stimulated pinocytosis, *Planta*, **111**: 199-208, 1973.
- [44] — The mechanism of infection of plant protoplasts by viruses, *Planta*, **112**: 323-332, 1973.
- [45] — Structural changes accompanying infection of tobacco protoplasts with two spherical viruses, *Planta*, **117**: 133-144, 1974.
- [46] — Structural and autoradiographic observations of the infection of tobacco protoplasts with Pea *Enation mosaic* virus, *Planta*, **119**: 247-256, 1974.
- [47] BURGESS J., WATTS J. W., FLEMING E. N., KING J. M., Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts, *Planta*, **110**: 291-301, 1973.
- [48] BURK L. G., Green and light-yellow haploid seedlings from anthers of sulfur tobacco, *J. Hered.*, **61**: 279, 1970.
- [49] BURK L. G., GWYNN G. R., CHAPLIN J. F., Diploidized haploids from aseptically cultured anthers of *N. tabacum*: a colchicine method applicable to plant breeding, *J. Hered.*, **63**: 355-360, 1972.
- [50] BUTENKO R. G., IWANTSOW A. I., The isolation of protoplasts from different strains of carrot and tobacco tissue cultures, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 79-83.
- [51] CARLSON P. S., Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*, *Science*, **168**: 487-489, 1970.
- [52] — Attempts to detect DNA mediated transformation in a higher plant, *Genetics*, **71**: 9-10, 1972.

- [53] — Locating genetic loci with aneuploids, *Molec. Gen. Genet.*, **114**: 273–278, 1972.
- [54] — Methionine sulfoximine — resistant mutants of tobacco, *Science*, **180**: 1366, 1973.
- [55] — The use of protoplasts for genetic research, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 598–602, 1973.
- [56] — Somatic cell genetics as a tool for plant breeding, [w] *Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants*, IAEA, Vienna 1973, 166–176.
- [57] — Towards a parasexual cycle in higher plants, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 497–505.
- [58] CARLSON P. S., DEARING R. D., FLOYD B. M., Defined mutants in higher plants, [w] *Genes, Enzymes and Populations*, red. A.M. Srb, Plenum Press, New York 1973, 99–107.
- [59] CARLSON P. S., SMITH H., DEARING R. D., Parasexual interspecific plant hybridization, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 2292–2294, 1972.
- [60] CHANDY L. P., NARAYANASWAMY S., Diploid and haploid androgenic plantlets from haploid *Datura* in vitro, *Indian J. Exp. Biol.*, **9**: 472–475, 1971.
- [61] CHU Z. C., WANG C. C., SUN C. S., CHIEN N. F., YIN K. C., HSU C., Investigations on the induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants, *Acta Bot. Sinica*, **15**: 1–11, 1973.
- [62] CLAPHAM D., In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **65**: 285–292, 1971.
- [63] — Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **69**: 142–155, 1973.
- [64] COCKING E. C., An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by TMV, *Planta*, **68**: 206–214, 1966.
- [65] COCKING E. C., POJNAR E., An electron microscopy of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by TMV, *J. Gen. Virol.*, **4**: 305–312, 1969.
- [66] COCKING E. C., Plant cell protoplasts — isolation and development, *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, **23**: 29–50, 1972.
- [67] — Isolation, fusion and development of protoplasts of higher plants, [w] *Yeast, Mould and Plant protoplasts*, red. J. Villanueva i in., Academic Press, London 1973, 309–317.
- [68] COCKING E. C., EVANS P. K., The isolation of protoplasts, [w] *Plant Tissue and Cell Culture*, red. H. E. Street, Blackwell, London 1973, 100–120.
- [69] COCKING E. C., POWER J. B., EVANS P. K., SAFWAT E., FREARSON E. M., HAYWARD C., BERNY S. F., GEORGE D., Naturally occurring differential drug sensitivities of cultured plant protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 341–350, 1974.
- [70] COLLINS G. B., LEGG P. D., LITTON C. C., KASPERBAUER M. J., Inheritance of resistance to black shank in *Nicotiana tabacum* L., *Canad. J. Genet. Cytol.*, **13**: 422–428, 1971.
- [71] COLLINS G. B., LEGG P. D., KASPERBAUER M. J., Chromosome numbers in anther-derived haploids of two *Nicotiana* species, *J. Hered.*, **63**: 113–118, 1972.
- [72] COLLINS G. B., SADASIVIAIAH R. S., Meiotic analysis of haploid and doubled haploid forms of *Nicotiana otophora* and *N. tabacum*, *Chromosoma*, **37**: 387–404, 1972.

- [73] COLLINS G. B., DUNWELL J. M., SUNDERLAND N., Irregular microspore formation in *Datura innoxia* and its relevance to anther culture, *Protoplasma*, **82**: 365-378, 1974.
- [74] COLLINS G. B., LEGG P. D., KASPERBAUER M. J., Use of anther-derived haploids in *Nicotiana*. I. Isolation of breeding lines differing in total alkaloid content, *Crop Sci.*, **14**: 77-80, 1974.
- [75] COLLINS G. B., SUNDERLAND N., Pollen-derived haploids of *Nicotiana knightiana*, *N. raimondii* and *N. attenuata*, *J. Exp. Bot.*, **25**: 1030-1035, 1974.
- [76] CONDEELIS J. S., The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of *Amaryllis belladonna*, *Exptl. Cell Res.*, **88**: 435-439, 1974.
- [77] CONSTABEL F., KIRKPATRICK J. W., GAMBORG O. L., Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*, *Can. J. Bot.*, **51**: 2105-2106, 1973.
- [78] CONSTABEL F., KAO K. N., Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethyleneglycol, *Can. J. Bot.*, **52**: 1603-1606, 1974.
- [79] CONSTABEL F., KURZ W. G. W., CHATSON B., GAMBORG O. L., Induction of partial synchrony in soybean cell cultures, *Exptl. Cell Res.*, **85**: 105-110, 1974.
- [80] CORDUAN G., Über die Wirkung unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Entstehung haploider Pflanzen aus Antheren von *Nicotiana tabacum* Varietäten, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 64-67, 1973.
- [81] — Regeneration of anther-derived plants of *Hyoscyamus niger* L., *Planta*, **127**: 27-36, 1975.
- [82] CORDUAN G., SPIX Ch., Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L., *Planta*, **124**: 1-11, 1975.
- [83] COUTTS R. H. A., Viruses in isolated protoplasts, a potential model system for studying nucleo-protein replication, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 353-365.
- [84] COUTTS R. H. A., GROUT B. W., Early stages in cell wall regeneration of tobacco mesophyll protoplasts: an electrophoretic study, *Plant Sci. Lett.*, **4**: 103-107, 1975.
- [85] COUTTS R. H. A., WOOD K. R., The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, **4**: 189-193, 1975.
- [86] DAVEY M. R., FOWLER M. W., STREET H. E., Cell clones contrasted in growth, morphology and pigmentation isolated from a callus culture of *Atropa belladonna* var. *lutea*, *Phytochemistry*, **10**: 2559-2575, 1971.
- [87] DAVEY M. R., STREET H. E., Studies on the growth in culture of plant cells. IX. Additional features of the fine structure of *Acer pseudoplatanus* L. cells cultured in suspension, *J. Exp. Bot.*, **22**: 90-95, 1971.
- [88] DAVEY M. R., COCKING E. C., Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts, *Nature*, **239**: 455-456, 1972.
- [89] DAVEY M. R., COCKING E. C., BUSH E., Isolation of legume root protoplasts, *Nature*, **244**: 460-461, 1973.
- [90] DAVEY M. R., SHORT K. C., The isolation, culture and fusion of legume and cornflower leaf protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 437-453.
- [91] DAVEY M. R., BUSH E., POWER J. B., Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast system, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 127-133, 1974.



- [92] DAVEY M. R., FREARSON E. M., WITHERS L. A., POWER J. B., Observations on the morphology, ultrastructure and regeneration of tobacco leaf epidermal protoplasts, *Plant Sci. Lett.*, **2**: 23-27, 1974.
- [93] DAVEY M. R., POWER J. B., Polyethylene-glycol induced uptake of micro-organisms into isolated higher plant protoplasts, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 54.
- [94] DEBERGH P., NITSCH C., Premiers résultats sur la culture in vitro de grains de pollen isolées chez la tomate, *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **276**: 1281-1284, 1973.
- [95] DEVREUX M., SACCARDO F., BRUNORI A., Plantes haploïdes et lignes isogéniques de *N. tabacum* obtenues par cultures d'anthers et de tiges in vitro, *Caryologia*, **24**: 141-148, 1971.
- [96] DEVREUX M., In vitro culture and mutation breeding, [w] Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants, IAEA, Vienna 1973, 41-50.
- [97] DEVREUX M., LANERI U., Anther culture, haploid plant, isogenic line and breeding researches in *N. tabacum*, [w] Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding, IAEA, Vienna, 1974, 101-107.
- [98] DIX P. J., STREET H. E., Effects of p-fluorophenylalanine (PFP) on the growth of cell lines differing in ploidy and derived from *Nicotiana sylvestris*, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 283-288, 1974.
- [99] MacDONALD I. M., GRANT W. F., Anther culture of pollen containing ethrel induced micronuclei, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **73**: 292-297, 1974.
- [100] DONN G., HESS D., POTRYKUS I., Wachstum und Differenzierung in aus isolierten Protoplasten von *Petunia hybrida* entstandenen Kallus, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 423-437, 1973.
- [101] DORE C., Production de plantes homozygotes mâles et femelles à partir d'anthers d'asperge cultivées in vitro (*Asparagus officinalis* L.), *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **278**: 2135-2138, 1974.
- [102] DOY C. H., GRESHOFF P. M., ROLFE B., Transgenesis of bacteria genes from *E. coli* to cultures of haploid *Lycopersicum esculentum* and haploid *Arabidopsis thaliana* plant cells, [w] The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms, red. J. K. Pollack i J. W. Lee, De Reidel Publ. Co., Dodrecht 1972, 21-37.
- [103] — Time-course of phenotypic expression of *E. coli* gene Z following transgenesis in haploid *Lycopersicum esculentum* cells, *Nature, New Biol.*, **244**: 90-91, 1973.
- [104] — Biological and molecular evidence for the transgenesis of genes from bacteria to plant cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 723-726, 1973.
- [105] DUDITS D., KAO K. N., CONSTABEL F., GAMBORG O. L., Effect of mitotic activity in carrot cells on frequency of division of carrot-barley heterokaryocytes, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 80.
- [106] DUNWELL J. M., SUNDERLAND N., Anther culture of *Solanum tuberosum* L., *Euphytica*, **22**: 317-323, 1973.
- [107] — Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum*. I. Early stages of culture, *J. Exp. Bot.*, **25**: 352-361, 1974.
- [108] — Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum*. II. Changes associated with embryogenesis, *J. Exp. Bot.*, **25**: 363-373, 1974.
- [109] — Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum*. III. The first sporophytic division, *J. Exp. Bot.*, **26**: 240-252, 1975.

- [110] DURAND J., POTRYKUS I., DONN G., Plantes issues de protoplastes de *Petunia*, Z. Pflanzenphysiol., 69: 26-34, 1973.
- [111] ENGVILD K. C., LINDE-LAURSEN I., LUNDQUIST A., Anther cultures of *Datura innoxia*: flower bud stage and embryoid level of ploidy, Hereditas, 72: 331-332, 1972.
- [112] ENGVILD K. C., Triploid petunias from anther cultures, Hereditas, 74: 144-147, 1973.
- [113] — Plantlet ploidy and flower bud size in tobacco anther cultures, Hereditas, 76: 320-322, 1974.
- [114] ENZMANN-BECKER G., Plating efficiency of protoplasts of tobacco in different light conditions, Z. Naturforschung, 28c: 470-471, 1973.
- [115] ERIKSSON T., JONASSON K., Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown in vitro, Planta, 89: 85-89, 1969.
- [116] ERIKSSON T., Isolation and fusion of plant protoplasts, [w] Les Cultures de Tissus de Plantes, Colloq. intern. C.N.R.S. 193, INRA, Paris 1971, 297-302.
- [117] ERIKSSON T., BONNETT H., GLIMELIUS K., WALLIN A., Technical advances in protoplasts isolation, culture and fusion, [w] Tissue Culture and Plant Science, red. H. E. Street, Academic Press, London 1974, 213-231.
- [118] EVANS P. K., KEATES A. G., COCKING E. C., Isolation of protoplasts from cereal leaves, Planta, 104: 178-181, 1972.
- [119] EVANS P. K., WOODCOCK J., KEATES A. G., Steps towards cell fusion: studies on cereal protoplasts and protoplasts of haploid tobacco, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 469-477.
- [120] FARKAS G. L., KALPAGAM C., FOGLEIN F., NYITRAI A., PREMECZ G., Why is the N gene not expressed in TMV-infected leaf protoplasts of *N. tabacum* cv. *Xanthii* ne plants?, IV International Symposium in Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 52.
- [121] FOULETIER B., Conditions favorisant la néoformation de cals haploïdes à partir d'anthères de riz cultivées in vitro, C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, 278: 2917-2920, 1974.
- [122] FOWKE L. C., BECH-HANSEN C. W., GAMBORG O. L., SHYLUK J. P., Electron microscopic observations of cultured cells and protoplasts of *Ammi visnaga*, Am. J. Bot., 60: 304-312, 1973.
- [123] FOWKE L. C., BECH-HANSEN C. W., GAMBORG O. L., Electron microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of *Ammi visnaga*, Protoplasma, 79: 235-248, 1974.
- [124] FOWKE L. C., BECH-HANSEN C. W., CONSTABEL F., GAMBORG O. L., A comparative study on the ultrastructure of cultured cells and protoplasts of soybean during cell division, Protoplasma, 81: 189-203, 1974.
- [125] FOWKE L. C., RENNIE P. J., KIRKPATRICK J. W., CONSTABEL F., Ultrastructural characteristics of intergeneric protoplast fusion, Can. J. Bot., 53: 272-278, 1975.
- [126] FREARSON E. M., POWER J. B., COCKING E. C., The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts, Develop. Biol., 33: 130-137, 1973.
- [127] FREARSON E. M., HAYWARD C., POWER J. B., Some consequences of the fusion and selective culture of *Petunia* and *Parthenocissus* protoplasts, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 79.

- [128] GALSTON A. W., ADAMS W. R., BRENNEMAN F. N., FUCHS Y., RANCILLAC M., REID K. R., RAVINDAR K., Macromolecular synthesis and developmental phenomena in oat protoplasts and calli, *Plant Physiol.*, suppl., 56: 38, 1975.
- [129] GAMBORG O. L., MILLER R. A., OJIMA O., Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell, *Exptl. Cell Res.*, 50: 151-158, 1968.
- [130] GAMBORG O. L., KAO K. N., MILLER R. A., FOWKE L. C., CONSTABEL F., Cell regeneration, division and plant development from protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 155-173.
- [131] GAMBORG O. L., SHYLUK J., KARTHA K., Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L., *Plant Sci. Lett.*, 4: 285-292, 1975.
- [132] GANAPATHY P. S., SCANDALIOS J. G., Malate dehydrogenase isozymes in haploid and diploid *Datura* species: their use as markers in somatic cell genetics, *J. Hered.*, 64: 186-188, 1973.
- [133] GEIER T., KOCHLENBACH H. W., Entwicklung von Embryonen und embryogene Kallus aus Pollenkörnern von *Datura meteloides* und *Datura innoxia*, *Protoplasma*, 78: 391-396, 1973.
- [134] GEORGE L., NARAYANASWAMY S., Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis, *Protoplasma*, 78: 467-470, 1973.
- [135] GIGOT C., SCHMITT C., HIRTH L., Modifications ultrastructurales observées au cours de la préparation de protoplastes à partir de cultures de tissus de tabac (*Nicotiana glutinosa* L.), *J. Ultrastruct. Res.*, 41: 418-432, 1972.
- [136] — Modifications ultrastructurales observées au cours de la préparation de protoplastes à partir de cultures de tissus de tabac (*Nicotiana glutinosa* L.), [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 65-77.
- [137] GILES K. L., An interspecific aggregate cell capable of cell wall regeneration, *Pl. Cell Physiol.*, 13: 207-210, 1972.
- [138] — Attempts to demonstrate genetic complementation by the technique of protoplast fusion, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, INRA, Paris 1973, 485-495.
- [139] — Complementation by protoplast fusion using mutant strains of maize, *Pl. Cell Physiol.*, 15: 281-285, 1974.
- [140] GLEBA J. J., BUTENKO R. G., SYTNIK K. M., Slijanie protoplastow i paraseksualnaja gibridizacija u *Nicotiana tabacum* L., *Dokł. A.N. SSSR*, 221: 1196-1198, 1975.
- [141] GLEBA J. J., SYTNIK K. M., BUTENKO R. G., Genetic consequences of protoplast fusion in *Nicotiana tabacum* L., IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 83.
- [142] GLIMELIUS K., WALLIN A., ERIKSSON T., Agglutinating effects of concavalin A on isolated protoplasts of *Daucus carota*, *Physiol. Plant.*, 31: 225-230, 1974.
- [143] GOSCH G., BAJAJ Y. P. S., REINERT J., Induction of growth and organogenesis in *Atropa belladonna* protoplasts, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 51.
- [144] GOULD A. R., STREET H. E., Kinetic aspects of synchrony in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus*, *J. Cell Sci.*, 17: 337-348, 1975.

- [145] GRAMBOW H. J., KAO K. N., MILLER R. A., GAMBORG O. L., Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures, *Planta*, **103**: 348-355, 1972.
- [146] GRESHOFF P. M., DOY C. H., Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture, *Austral. J. Biol. Sci.*, **25**: 259-264, 1972.
- [147] — Development and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum*, *Planta*, **107**: 161-170, 1972.
- [148] — Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera, *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**: 132-141, 1974.
- [149] GROUT B. W., COUTTS R. H. A., Additives for the enhancement of fusion and endocytosis in higher plant protoplasts: an electrophoretic study, *Plant Sci. Lett.*, **2**: 397-403, 1974.
- [150] GROUT B. W., Cellulose microfibrill deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco mesophyll protoplasts: a deep etch study, *Planta*, **123**: 275-282, 1975.
- [151] GRUNEWALDT J., MALEPSZY S., Beobachtungen an Antherenkallus von *Hordeum vulgare* L., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **75**: 55-61, 1975.
- [152] GUHA S., MAHESHWARI S. C., In vitro production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature*, **204**: 497, 1964.
- [153] — Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro, *Nature*, **212**: 97-98, 1966.
- [154] — Development of embryoids from pollen grains of *Datura* in vitro, *Phytomorphology*, **17**: 454-461, 1967.
- [155] GUHA S., IYER R. D., GUPTA N., SWAMINATHAN M. S., Totipotency of gametic cells and the production of haploids in rice, *Curr. Sci.*, **39**: 174-176, 1970.
- [156] GUHA - MUKHERJEE S., Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen, *J. Exp. Bot.*, **24**: 139-144, 1973.
- [157] GUO C., Effects of chemical and physical factors on the chromosome number in *Nicotiana* anther callus cultures, *In Vitro*, **7**: 381-386, 1972.
- [158] GUPTA N., Preferential growth of haploid plant cells in vitro, *Genetics*, suppl. **71**: 2, 1972.
- [159] GUPTA N., CARLSON P. S., Preferential growth of haploid plant cells in vitro, *Nature, New Biol.*, **239**: 86, 1972.
- [160] HALL M. D., COCKING E. C., The response of isolated *Avena coleoptile* protoplasts to indol - 3 - acetic acid, *Protoplasma*, **79**: 225-234, 1974.
- [161] HALPERIN W., Embryos from somatic plant cells, [w] *Control Mechanisms of Expression Cellular Phenotypes*, red. H. A. Padykula, Academic Press, New York 1970, 169-191.
- [162] HANKE D. E., NORTHCOTE D. H., Cell wall formation by soybean callus protoplasts, *J. Cell Sci.*, **14**: 29-50, 1974.
- [163] Haploid plantlet of *Brassica campestris* from anther culture in vitro, *Acta Bot. Sinica*, **17**: 167, 1975.
- [164] HARADA H., A new method for obtaining protoplasts from mesophyll cells, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 77-80, 1973.
- [165] — Culture in vitro de protoplastes obtenus à partir de tissu foliaire d'*Ipomoea hederifolia* et de *Calystegia sepium* (L.) R. Br., [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 127-131.

- [166] HARN C., Studies on anther culture in *Solanum nigrum*, SABRAO Newslett., 3: 39-42, 1971.
- [167] — Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. II. Cytological and histological observations, SABRAO Newslett., 4: 27-32, 1972.
- [168] HARN C., KIM M. Z., Induction of callus from anthers of *Prunus armeniaca*, Korean J. Breed., 4: 49-53, 1972.
- [169] HARTMAN J. X., KAO K. N., GAMBORG O. L., MILLER R. A., Immunological methods for the agglutination of protoplasts from cell suspension cultures of different genera, Planta, 112: 45-56, 1973.
- [170] HEIMER Y. M., FILNER P., Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells, Biochim. Biophys. Acta, 215: 152-165, 1970.
- [171] HELLMAN S., REINERT J., Protoplasten aus Zellkulturen von *Daucus carota*, Protoplasma, 72: 479-484, 1971.
- [172] HESLOP-HARRISON J., Wall pattern formation in angiosperm morphogenesis, [w] Control Mechanisms of Growth and Differentiation, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1971, 277-300.
- [173] HESS D., Transformationen an höheren Organismen, Naturwiss., 59: 348-355, 1972.
- [174] — Versuche zur Transformation an höheren Pflanzen: Nachweis von Heterozygoten in Versuchen zur Transplantation von Genen für Anthocyan synthese bei *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., 66: 155-166, 1972.
- [175] HESS D., POTRYKUS I., Teilung isolierter Protoplasten von *Petunia hybrida*, Naturwiss., 59: 273-274, 1972.
- [176] HESS D., Transformationsversuche an höheren Pflanzen: Untersuchungen zur Realisation des Exosomen Modells der Transformation von *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., 68: 432-440, 1973.
- [177] — Die Aufnahme von FITC und FITC-serumalbumin in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., 69: 280-286, 1973.
- [178] HESS D., POTRYKUS I., DONN G., DURAND J., HOFFMANN F., Transformation experiments in higher plants; prerequisites for the use of isolated protoplasts (isolation from mesophyll and callus cultures, uptake of proteins and DNA, and regeneration of whole plants), [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. Intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 343-351.
- [179] HESS D., GRESHOFF P. M., FIELITZ U., GLEISS D., Uptake of protein and bacteriophage into swelling and germinating pollen of *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., 74: 371-376, 1974.
- [180] HESS D., LORZ H., WEISSERT E. M., Die Aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende Pollen von *Petunia hybrida* und *Nicotiana glauca*, Z. Pflanzenphysiol., 74: 52-63, 1974.
- [181] HEYN R. F., SCHILPEROORT R. A., The use of protoplasts to follow the fate of *Agrobacterium tumefaciens* DNA on incubation with tobacco cells, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 385-395.
- [182] HILDEBRANDT A. C., Growth and differentiation of plant cell cultures, [w] Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes, red. H. A. Padykula, Academic Press, New York 1970, 147-167.
- [183] HINWAY E. E., Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba*, Z. Pflanzenphysiol., 74: 95-105, 1974.

- [184] HOFFMANN F., Die Aufnahme doppelt-markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., **69**: 249–261, 1973.
- [185] HOFFMANN F., HESS D., Die Aufnahme radioaktiv markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*, Z. Pflanzenphysiol., **69**: 81–83, 1973.
- [186] HOLDEN D. J., HILDEBRANDT A. C., Behaviour of plant cell protoplasts in microculture, *Phyton*, **29**: 47–54, 1972.
- [187] HOLL B. F., Cellular environment and the transfer of genetic information, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 509–516.
- [188] HOLL B. F., GAMBORG O. L., OHYAMA K., PELCHER L., Genetic transformation in plants, [w] *Tissue Culture and Plant Science*, red. H. E. Street, Academic Press, London 1974, 301–327.
- [189] HONDA Y., MATSUI C., OTSUKI Y., TAKEBE I., Ultrastructure of tobacco mesophyll protoplasts inoculated with cucumber mosaic virus, *Phytopath.*, **64**: 30–34, 1974.
- [190] HORINE R. K., RUESINK A. W., Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture, *Plant Physiol.*, **50**: 438–455, 1972.
- [191] HOWLAND G. P., Partial haploidization with parafluorophenylalanine, *HIS*, **9**: 16–17, 1974.
- [192] HUGHES K. W., BELL S. L., CAPONETTI J. D., Anther - derived haploids of the African violet, *Can. J. Bot.*, **53**: 1442–1444, 1975.
- [193] ITO M., Studies on the behavior of meiotic protoplasts. I. Isolation from microsporocytes of liliaceous plants, *Bot. Mag.*, **86**: 133–141, 1973.
- [194] — Studies on the behavior of meiotic protoplasts. II. Induction of a high fusion frequency in protoplasts from liliaceous plants, *Pl. Cell Physiol.*, **14**: 865–872, 1973.
- [195] ITO M., MAEDA M., Fusion of meiotic protoplasts in liliaceous plants, *Exptl. Cell Res.*, **80**: 453–456, 1973.
- [196] IRIKURA Y., SAKAGUCHI S., Induction of 12 - chromosome plants from anther culture in a tuberous *Solanum*, *Potato Res.*, **15**: 170–173, 1972.
- [197] IRIKURA Y., Induction of haploid plants by anther culture in tuber - bearing species and interspecific hybrids of *Solanum*, *Potato Res.*, **18**: 133–140, 1975.
- [198] IYER R. D., RAINA S. K., The early ontogeny of embryoids and callus from pollen, and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice, *Planta*, **104**: 146–156, 1972.
- [199] JOHNSON C. B., GRIERSON D., SMITH H., Expression of  $\lambda$  plac 5 DNA in cultured cells of a higher plant, *Nature, New Biol.*, **244**: 105–106, 1973.
- [200] JONES R. L., ARMSTRONG J. E., TAIZ L., Barley aleurone protoplasts; some observations on their structure and physiology, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 109–117.
- [201] JORDAN M., Multizelluläre Pollen bei *Prunus avium* nach in vitro Kultur, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **71**: 358–363, 1974.
- [202] JULLIEN M., Régénération de plantes entières à partir de cellules séparées des feuilles de *Nicotiana tabacum* diploïdes et haploïdes, *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **273**: 1287–1290, 1971.
- [203] KAMEYA T., HINATA K., Culture of anther and pollen in *Brassica species*, *Japan J. Breed., suppl.*, **19**: 10–11, 1969.

- [204] — Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*, Japan J. Breed., **20**: 82–87, 1970.
- [205] KAMEYA T., TAKAHASHI N., The effect of inorganic salts on fusion of protoplasts from roots and leaves of *Brassica species*, Japan J. Genet., **47**: 215–217, 1972.
- [206] KAMEYA T., UCHIMYA H., Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot, *Planta*, **103**: 356–360, 1972.
- [207] KAMEYA T., The effect of gelatin on aggregation of protoplasts from higher plants, *Planta*, **115**: 77–82, 1973.
- [208] KANAI R., EDWARDS G. E., Enzymatic separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from C<sub>4</sub> plants, *Naturwiss.*, **60**: 157, 1973.
- [209] KAO K. N., KELLER W. A., MILLER R. A., Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean, *Exptl. Cell Res.*, **62**: 338–340, 1970.
- [210] KAO K. N., GAMBORG O. L., MILLER R. A., KELLER W. A., Cell division in cells regenerated from protoplasts of soybean, *Nature, New Biol.*, **232**: 124, 1971.
- [211] KAO K. N., GAMBORG O. L., MICHAYLUK M. R., KELLER W. A., MILLER R. A., The effect of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained division in plant protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 207–213.
- [212] KAO K. N., MICHAYLUK M. R., A method for high frequency intergeneric plant protoplasts fusion, *Planta*, **115**: 355–367, 1974.
- [213] KARTHA K. K., GAMBORG O. L., CONSTABEL F., KAO K. N., Fusion of rapeseed and soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes, *Can. J. Bot.*, **52**: 2435–2436, 1974.
- [214] KARTHA K. K., MICHAYLUK M. R., KAO K. N., GAMBORG O. L., CONSTABEL F., Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L., cv. Zephyr), *Plant Sci. Lett.*, **3**: 265–271, 1974.
- [215] KASPERBAUER J. M., COLLINS G. B., Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther - derived haploids in tobacco, *Crop Sci.*, **12**: 98–101, 1972.
- [216] — Anther - derived haploids in tobacco; evaluation of procedures, *Crop Sci.*, **14**: 305–307, 1974.
- [217] KAUL K., SABHARVAL P. S., Effect of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue culture, *Plant Physiol.*, **47**: 691–695, 1971.
- [218] KELLER W. A., HARVEY B., GAMBORG O. L., MILLER R. A., EVELEIGH D. E., Plant protoplasts for use in somatic cell hybridization, *Nature*, **226**: 280–282, 1970.
- [219] KELLER W. A., HARVEY B. L., KAO K. N., MILLER R. A., GAMBORG O. L., Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, J. Tempe, INRA, Paris 1973, 455–463.
- [220] KELLER W. A., MELCHERS G., The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion, *Z. Naturforschg.*, **28c**: 737–741, 1973.
- [221] KIMATA M., SAKAMOTO S., Callus induction and organ redifferentiation of *Triticum*, *Aegilops* and *Agropyron* by anther culture, *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Jap.*, **22**: 55, 1971.

- [222] — Production of haploid albino plants of *Aegilops* by anther culture, Japan J. Genet., **47**: 61–63, 1972.
- [223] KING P. J., MANSFIELD K. J., STREET H. E., Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures, Can. J. Bot., **51**: 1807–1823, 1973.
- [224] KING P. J., COX B. J., FOWLER M. W., STREET H. E., Metabolic events in synchronised cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L., Planta, **117**: 109–122, 1974.
- [225] KOCHBAR T., SABHARVAL P., ENGELBERG J., Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique, J. Hered., **62**: 59–61, 1971.
- [226] KOCHLENBACH H. W., GEIER T., Embryonen aus in vitro kultivierten Antheren von *Datura meteloides* Dun., *Datura wrightii* Regel und *Solanum tuberosum* L., Z. Pflanzenphysiol., **67**: 161–165, 1972.
- [227] KUBICKI B., TELEŻYŃSKA J., MILEWSKA - PAWLICZUK E., Induction of embryoids from pollen grains of apple, Acta Soc. Bot. Pol., w druku.
- [228] KUCHERLAPATI S., CREAGAN R. P., RUDDLE F. H., Progress in human gene mapping by somatic cell hybridization, [w] The Cell Nucleus, red. H. Busch, Academic Press, New York 1974, 209–222.
- [229] KUO J., WANG Y., CHIEN N., KU S., Investigations on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annum* L., Acta Bot. Sinica, **15**: 37–52, 1973.
- [230] LANDGREN C. R., TORREY J. G., The culture of protoplasts derived from explants of seedling pea root, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somaticques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 281–289.
- [231] LAZAR G., BORBELY G., UDVARDY J., PREMECZ G., FARKAS G. L., Osmotic shock triggers an increase in ribonuclease level in protoplasts isolated from tobacco leaves, Plant Sci. Lett., **1**: 53–57, 1973.
- [232] LEDOUX L., HUART R., JACOBS M., Fate of exogenous DNA in *Arabidopsis thaliana*. II. Evidence for replication and preliminary results at the biological level, [w] Informative Molecules in Biological Systems, red. L. Ledoux, North Holland, Amsterdam 1971.
- [233] — Fate and biological effects of exogenous DNA in *Arabidopsis thaliana*, [w] The Way Ahead in Plant Breeding, Eucarpia, 1972, 165–184.
- [234] LEDOUX L., BROWN J., POL C., HUART R., JACOBS M., REMY J., WATTERS C., Fate of exogenous DNA in mammals and plants, Adv. in Biosciences, **8**: 345–367, 1972.
- [235] LEDOUX L., HUART R., JACOBS M., DNA - mediated genetic correction of thiamineless *Arabidopsis thaliana*, Nature, **249**: 17–21, 1974.
- [236] LESCURE A. M., Selection of markers of resistance to base analogues in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*, Plant Sci. Lett., **1**: 375–383, 1973.
- [237] LINSMEIER E. M., SKOOG F., Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., **18**: 100–127, 1965.
- [238] LORENZINI M., Obtention de protoplastes de tubercule de pomme de terre, C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, **276**: 1839–1842, 1973.
- [239] MACKENZIE I. A., BUI - DANG - HA D., DAVEY M. R., Some aspects of the isolation, fine structure and growth of protoplasts from *Asparagus officinalis* L., [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somaticques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 291–299.
- [240] MAEDA E., HATIWARA T., Enzymatic isolation of protoplasts from the rice leaves and callus cultures, Proc. Crop Sci. Soc. Jap., **43**: 68–76, 1974.



- [241] MALEPSZY S., GRUNEWALDT J., Ein Beitrag zur Erzeugung von Haploiden bei *Hordeum vulgare*, Z. Pflanzenzüchtg., **72**: 206–211, 1974.
- [242] MALEPSZY S., A contribution to the production of haploids in rye, *Secale cereale* L., Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol., **23**: 167–172, 1975.
- [243] MALIGA P., BREZNOVITS S. A., MARTON L., Streptomycin - resistant plants from callus culture of haploid tobacco, Nature, New Biol., **244**: 29–30, 1973.
- [244] — 5 - bromodeoxyuridine resistant cell lines from haploid tobacco, Plant Sci. Lett., **1**: 119–121, 1973.
- [245] MARETZKI A., NICKELL L. G., Formation of protoplasts from sugarcane cell suspensions and the regeneration of cell cultures from protoplasts, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 51–63.
- [246] MEHRA - PALTA A., PALTA H. K., HERMANN R. G., Isolation and culture of leaf mesophyll protoplasts of plastome mutants and wild - type *Oenothera hookeri*, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 84.
- [247] MELCHERS G., LABIB G., Plants from protoplasts; significance for genetics and breeding, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 367–372.
- [248] MELCHERS G., Haploids for breeding by mutation and recombination, [w] Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding, IAEA, Vienna 1974, 221–231.
- [249] MELCHERS G., LABIB G., Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco, Molec. Gen. Genet., **135**: 277–294, 1974.
- [250] MESSERSCHMIDT M., Kallusbildung und Differenzierung aus isolierten Protoplasten von *Pharbitis nil*, Z. Pflanzenphysiol., **74**: 175–178, 1974.
- [251] MEYER Y., Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium, Protoplasma, **81**: 363–372, 1974.
- [252] MEYER Y., ABEL O., Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts, Planta, **123**: 33–40, 1975.
- [253] — Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo - wall and wall formation, Planta, **125**: 1–14, 1975.
- [254] MICHAYLUK M. R., KAO K. N., A comparative study of sugars and sugar alcohols on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts, Z. Pflanzenphysiol., **75**: 181–185, 1975.
- [255] MILLER R. A., GAMBORG O. L., KELLER W. A., KAO K. N., Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts, Canad. J. Genet. Cytol., **13**: 347–353, 1971.
- [256] MITCHISON J. M., The Biology of the Cell Cycle, Cambridge University Press, London, 1971.
- [257] MONDEIL F., Irradiation de microspores en culture d'anthers: essai d'une nouvelle technique d'obtention de mutations immédiatement détectables et fixables (application à *Nicotiana tabacum*), Ann. Amelior. Plant., **24**: 1–11, 1974.
- [258] MOTOYOSHI F., Protoplasts isolated from callus cells of maize endosperm, Exptl. Cell Res., **68**: 452–456, 1971.
- [259] MOTOYOSHI F., KING J. M., WATTS J. W., Problems associated with the

- production of stable protoplasts from cells of tobacco mesophyll, *Ann. Bot.*, **38**: 667-671, 1974.
- [260] MOURAS A., LUTZ A., Augmentation de la fréquence des mitoses dans les cultures de tissus, en vue d'analyses caryologique, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **277**: 1645-1648, 1973.
- [261] MOURAS A., Sur l'utilisation des protoplastes en caryologie: application au dénombrement chromosomique des cultures de tissus de tabac, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **281**: 255-258, 1975.
- [262] MURASHIGE J., SKOOG F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497, 1962.
- [263] NAGATA T., TAKEBE I., Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts, *Planta*, **92**: 301-308, 1970.
- [264] — Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium, *Planta*, **99**: 12-20, 1971.
- [265] NAGATA T., YAMAKI T., Electron microscopy of isolated tobacco mesophyll protoplasts cultured in vitro, *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**: 452-459, 1973.
- [266] NAKAMURA A., ITAGAGI R., Anther culture in *Nicotiana* and the characteristics of the haploid plants, *Japan J. Breed.*, **23**: 71, 1973.
- [267] NAKATA K., TANAKA M., Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco, *Japan J. Genet.*, **43**: 65-71, 1968.
- [268] — Methods for producing high-grade haploid plants from anther culture of tobacco, *Japan J. Breed., suppl.*, **20**: 7-8, 1970.
- [269] NAKATA K., Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. I. Analysis with leaf color character, *Japan J. Breed.*, **21**: 29-34, 1971.
- [270] NAKATA K., KURIHARA T., Competition among pollen grains for haploid tobacco plant formation by anther culture. II. Analysis with resistance to TMV and wildfire disease, leaf color and leaf base character, *Japan J. Breed.*, **22**: 92-98, 1972.
- [271] NARAYANASWAMY S., CHANDY L. P., In vitro induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metel* L., *Ann. Bot.*, **35**: 535-542, 1971.
- [272] — Morphogenesis of belladonna (*Atropa belladonna* L.) plantlets from pollen in culture, *Indian J. Exp. Biol.*, **10**: 382-384, 1972.
- [273] NIIZEKI H., OONO K., Induction of haploid rice plant from anther culture, *Proc. Japan Acad.*, **44**: 554-557, 1968.
- [274] — Rice plants obtained by anther culture, [w] *Les Cultures de Tissus de Plantes*, Colloq. intern. C.N.R.S. 193, INRA, Paris 1971, 251-257.
- [275] NIIZEKI M., GRANT W. F., Callus, plantlet formation and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*, *Can. J. Bot.*, **49**: 2041-2051, 1971.
- [276] NIIZEKI M., KITA F., Studies on plant cell and tissue culture. III. In vitro induction of callus from anther culture of forage crops, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **57**: 293-300, 1974.
- [277] NIIZEKI M., Studies on plant cell and tissue culture. IV. Effect of para-fluorophenylalanine on haploid and diploid cells of tobacco plant in vitro, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **57**: 349-356, 1974.
- [278] — Studies on plant cell and tissue culture. V. Effect of different kinds of media on the variation of chromosome numbers in tobacco callus and regenerated plants, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **57**: 357-367, 1974.

- [279] NILLSON - TILGREN T., WETTSTEIN - KNOWLES P., When is the male plastome eliminated?, *Nature*, **227**: 1265-1266, 1970.
- [280] NISHI T., MITSUOKA S., Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant, *Japan J. Genet.*, **44**: 341-346, 1969.
- [281] NISHI S., OOSAWA K., TOYOTA T., Studies on the anther culture of vegetable crops. I. Differentiation of young seedlings of some vegetable crops, *Bull. Veg. Orn. Crops Res. Sta., Ser. A*, **1**: 1-40, 1974.
- [282] NITSCH C., NOREEL B., Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivée dans l'anthere ou isolé de l'anthere. *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **276**: 303-306, 1973.
- [283] — Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture, [w] *Genes, Enzymes and Populations*, red. A. M. Srb, Plenum Press, New York 1973, 129-144.
- [284] NITSCH C., La culture de pollen isolé sur milieu synthétique, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **274**: 1031-1034, 1974.
- [285] NITSCH J. P., NITSCH C., HAMON S., Réalisation expérimentale de l'androgénèse chez divers *Nicotiana*, *C.R. Séances Soc. Biol.*, **162**: 369, 1968.
- [286] NITSCH J. P., Experimental androgenesis in *Nicotiana*, *Phytomorphology*, **19**: 389-404, 1969.
- [287] NITSCH J. P., NITSCH C., Haploid plants from pollen grains, *Science*, **163**: 85-87, 1969.
- [288] NITSCH J. P., NITSCH C., HAMON S., Production de *Nicotiana* diploïdes à partir de cals haploïdes cultivés in vitro, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **269**: 1275-1278, 1969.
- [289] NITSCH J. P., NITSCH C., PEREAU - LEROY P., Obtention de mutants à partir de *Nicotiana* haploïdes issus de grains de pollen, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **269**: 1650-1652, 1969.
- [290] NITSCH J. P., NITSCH C., Obtention de plantes haploïdes à partir de pollen, *Bull. Soc. Bot. France*, **117**: 339-360, 1970.
- [291] NITSCH J. P., The production of haploid embryos from pollen grains, [w] *Pollen — Physiology and Development*, red. J. Heslop - Harrison, Butterworths, London 1971, 234-236.
- [292] NITSCH J. P., OHYAMA K., Obtention de plantes à partir de protoplastes haploïdes cultivés in vitro, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **273**: 801-804, 1971.
- [293] NITSCH J. P., Haploid plants from pollen, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **67**: 3-18, 1972.
- [294] NITZSCHE W., Herstellung haploider Pflanzen aus Festuca - Lolium Bastarden, *Naturwiss.*, **57**: 199-200, 1970.
- [295] — Mitotische Chromosomenreduktion in höheren Pflanzen durch 3 - fluoro-fenylalanin, *Naturwiss.*, **60**: 390, 1973.
- [296] NOREEL B., Etude cytologique de l'androgénèse expérimentale chez *Nicotiana tabacum* et *Datura innoxia*, *Bull. Soc. Bot. France*, **117**: 461-468, 1970.
- [297] NÖTH M. H., ABEL W. O., Zur Entwicklung haploider Pflanzen aus unreifen Mikrosporen verschiedener *Nicotiana* - Arten, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **65**: 277-284, 1971.
- [298] NOVAK F. J., Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **72**: 46-54, 1974.
- [299] NOVAK F. J., VYSKOT B., Karyology of callus cultures derived from *N.*

- tabacum* L. haploids and ploidy of regenerants, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **75**: 62–70, 1975.
- [300] OHYAMA K., GAMBORG O. L., MILLER R. A., Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts, *Can. J. Bot.*, **50**: 2077–2080, 1972.
- [301] — Isolation and properties of DNA from protoplasts of cell suspension cultures of *Ammi visnaga* and carrot (*Daucus carota* L.), *Plant Physiol.*, **50**: 319–321, 1972.
- [302] OHYAMA K., NITSCH J. P., Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves, *Pl. Cell Physiol.*, **13**: 229–236, 1972.
- [303] OHYAMA K., GAMBORG O. L., SHYLUK J. P., MILLER R. A., Studies on transformation; uptake of exogenous DNA by plant protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 423–427.
- [304] OHYAMA K., Properties of 5-bromodeoxyuridine — resistant lines of higher plant cells in liquid culture, *Exptl. Cell Res.*, **89**: 31–38, 1974.
- [305] OPATRNY Z., Androgenesis in vitro in anther cultures of chlorophyll mutants of *N. tabacum*, *Biol. Plant.*, **15**: 286–289, 1973.
- [306] OTSUKI Y., TAKEBE I., Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants, *Pl. Cell Physiol.*, **10**: 917–921, 1969.
- [307] OTSUKI Y., TAKEBE I., HONDA Y., KAJITA S., Infection of tobacco mesophyll protoplasts by potato virus X., *J. Gen. Virol.*, **22**: 375–385, 1974.
- [308] OUYANG T., HU H., CHUANG C., CHIA C., TSENG C., Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro, *Scientia Sinica*, **16**: 79–95, 1973.
- [309] OWENS L., Uptake of hybrid col E1 plasmid DNA by plant cells, *Plant Physiol.*, suppl., **56**: 38, 1975.
- [310] PALMER J. E., WILDHOLM J., Characterization of carrot and tobacco cell cultures resistant to p-fluorophenylalanine, *Plant Physiol.*, **56**: 233–238, 1975.
- [311] PAMPLIN E. J., CHAPMAN J. M., Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue culture: changes in the activity enzymes of the chlorophyll biosynthetic pathway, *J. Exp. Bot.*, **26**: 212–220, 1975.
- [312] PAN C., PAI S. H., KUAN C. L., YU H. H., Certain factors affecting the frequency of induction of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants, *Acta Bot. Sinica*, **17**: 166, 1975.
- [313] PANDEY K. K., Theory and practice of induced androgenesis, *New Phytol.*, **72**: 1129–1140, 1973.
- [314] PELCHER L. E., GAMBORG O. L., KAO K. N., Bean mesophyll protoplasts; production, culture and callus formation, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 107–111, 1974.
- [315] PELCHER L. E., KAO K. N., GAMBORG O. L., YODER O. C., GRACEN V. E., Effects of *Helminthosporium maydis* race T toxin on protoplasts of resistant and susceptible corn (*Zea mays*), *Can. J. Bot.*, **53**: 427–431, 1975.
- [316] PELLETIER G., DURRAN V., Recherche de tissus nourriciers pour la réalisation de l'androgénèse in vitro chez *N. tabacum*, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **275**: 35–37, 1972.
- [317] PELLETIER G., ILAMI M., Les facteurs de l'androgénèse in vitro chez *Nicotiana tabacum*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **68**: 97–114, 1972.
- [318] PELLETIER G., RAQUIN C., SIMON G., La culture in vitro d'anthères d'asperge (*Asparagus officinalis*), *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **274**: 848–852, 1972.
- [319] PELLETIER G., Les conditions et les premiers stades de l'androgénèse in

- vitro chez *Nicotiana tabacum*, Bull. Soc. Bot. France, Memoires 1973, 261-266.
- [320] PICARD E., de RUYSER J., Obtention de plantules haploïdes de *Triticum aestivum* L. à partir de culture d'anthers in vitro C.R. Acad. Sci., Paris, Ser D, **277**: 1463-1466, 1973.
- [321] — Nouveaux résultats concernant la culture d'anthers in vitro de blé tendre (*Triticum aestivum*): effets d'un choc thermique et de la position de l'anthere dans l'épi, C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, **281**: 127-130, 1975.
- [322] PILET P. E., PRAT R., ROLAND J., Morphology, RN - ase and transaminase of root protoplasts, Pl. Cell Physiol., **13**: 297-309, 1972.
- [323] PILET P. E., Transaminase activity in root protoplasts enzymatically and mechanically prepared, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 99-107.
- [324] PILET P. E., SENN A., Effet du  $Ca^{++}$  et du  $K^+$  sur la mobilité électrophoretique des protoplastes, C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D, **278**: 269-272, 1974.
- [325] PINTO da SILVA P. G., Isolation of protoplasts from higher plant cells, Naturwiss., **56**: 41, 1969.
- [326] POIRIER - HAMON S., RAO P. S., HARADA H., Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of *Antirrhinum majus* (snapdragon): growth and organisation of embryoids, J. Exp. Bot., **25**: 752-760, 1974.
- [327] POTRYKUS I., Fusion von Protoplasten mit gut sichtbaren Kernen, Naturwiss., **58**: 328, 1971.
- [328] — Intra - and interspecific fusion of protoplasts from petals *Torenia bailloni* and *Torenia fournieri*, Nature, New Biol., **231**: 57-58, 1971.
- [329] — Isolation, fusion and culture of protoplasts of *Petunia*, [w] Yeast, Mould and Plant Protoplasts, red. J. R. Villanueva i in., Academic Press, London 1973, 319-322.
- [330] POTRYKUS I., HOFFMANN F., Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants, Z. Pflanzenphysiol., **69**: 287-289, 1973.
- [331] POTRYKUS I., Transplantation of chloroplasts into protoplasts of *Petunia*, Z. Pflanzenphysiol., **70**: 364-366, 1973.
- [332] POWER J. B., COCKING E. C., Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response, J. Exp. Bot., **21**: 64-70, 1970.
- [333] POWER J. B., CUMMINS S. E., COCKING E. C., Fusion of isolated plant protoplasts, Nature, **225**: 1016-1018, 1970.
- [334] POWER J. B., FREARSON E. M., COCKING E. C., The preparation and culture of spontaneously fused tobacco leaf spongy - mesophyll protoplasts, Biochem. J., **123**: 29-30, 1971.
- [335] POWER J. B., FREARSON E. M., The inter - and intraspecific fusion of plant protoplasts; subsequent developments in culture, with reference to crown gall callus and tobacco and petunia leaf systems, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 410-421.
- [336] PREMECZ G., FOGLEIN F., KALPAGAM C., NYITRAI A., FARKAS G. L., TMV-RNA synthesis in isolated tobacco leaf protoplasts as compared to that in the cells in tissues, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 76.

- [337] RAGHAVAN V., Induction of haploid plants from anther cultures of henbane, *Z. Pflanzenphysiol.*, **76**: 89–92, 1975.
- [338] RAINA S. K., IYER R. D., Differentiation of diploid plants from pollen callus of *Solanum melongena* L., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **70**: 275–280, 1973.
- [339] RAJ B., HERR J. M., The isolation of protoplasts from the placenta cells of *Solanum nigrum* L., *Protoplasma*, **69**: 291–300, 1970.
- [340] — Isolation of protoplasts from the placental cells of *Lycopersicum pimpinellifolium* Mill., *Exptl. Cell Res.*, **64**: 479–481, 1971.
- [341] RAJASEKHAR E. W., Nuclear divisions in protoplasts isolated from pollen tetrads of *Datura metel*, *Nature*, **246**: 223–224, 1973.
- [342] — Haploid protoplasts from pollen, *Gowt. India Atom. Energy Comiss. Rep.*, **764**: 61–62, 1974.
- [343] RAQUIN C., PILET V., Production de plantules à partir d'anthers de pétonias cultivées in vitro, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser D*, **274**: 1010–1022, 1972.
- [344] RASHID A., STREET H. E., The development of haploid embryos from anther cultures of *Atropa belladonna* L., *Planta*, **113**: 263–270, 1973.
- [345] — Segmentations in microspores of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tabacum* which led to embryoid formation in anther cultures, *Protoplasma*, **80**: 323–334, 1974.
- [346] — Growth, embryogenic potential and stability of a haploid cell culture of *Atropa belladonna* L., *Plant Sci. Lett.*, **2**: 89–94, 1974.
- [347] RAVEH D., HUBERMAN E., GALUN E., In vitro culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities, *In Vitro*, **9**: 216–222, 1973.
- [348] RAVEH D., GALUN E., Rapid regeneration of plants from tobacco protoplasts plated at low densities, *Z. Pflanzenphysiol.*, **76**: 76–79, 1975.
- [349] REINERT J., HELLMANN S., Mechanism of the formation of polynuclear protoplasts from cells of higher plants, *Naturwiss.*, **58**: 419, 1971.
- [350] — Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts of different origin, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 309–315.
- [351] REINERT J., BAJAJ Y. P. S., HEBERLE E., Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen, *Protoplasma*, **84**: 191–196, 1975.
- [352] REINERT J., GOSCH G., BAJAJ Y. P. S., Induction of interspecific and intergeneric fusion by various fusogenes, *IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts*, Nottingham 1975, 81.
- [353] ROLAND J. C., PRAT R., Les protoplastes et quelques problèmes concernant le rôle et l'élaboration des parois, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, INRA, Paris 1973, 243–271.
- [354] ROMERO J., Isolement de cellules et de protoplastes à partir de feuilles de *Vicia faba* L., *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **6**: 570–577, 1971.
- [355] RONA J. P., GRIGNON C., Obtention de protoplastes à partir de suspensions de cellules d'*Acer pseudoplatanus*, *C.R. Acad., Sci., Paris, Ser. D*, **274**: 2976–2979, 1972.
- [356] RUDDLE F. H., Utilization of somatic cells for genetic analysis: possibilities and problems, [w] *Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes*, red. H.A. Padykula, Academic Press, New York 1970, 233–264.
- [357] RUESINK A., Protoplasts of plant cells, [w] *Methods in Enzymology*, vol. 23, red. A. San Pietro, Academic Press, New York 1971, 197–209.
- [358] — Surface membrane properties of isolated protoplasts, [w] *Protoplastes et*

- Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 41-49.
- [359] SAKAI F., TAKEBE I., RNA and protein synthesis in protoplasts of tobacco leaves, *Biochim. Biophys. Acta*, **224**: 531-540, 1970.
- [360] SAKAI F., DAWSON J. R. O., WATTS W. J., Protein synthesis in tobacco protoplasts infected with Cowpea chlorotic mottle virus, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 77.
- [361] SANGWAN R. S., NOREEL B., Pollen embryogenesis in *Pharbitis nil*, *Naturwiss.*, **62**: 440, 1975.
- [362] SCHENK R. U., HILDEBRANDT A. C., Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases, *Crop Sci.*, **9**: 629-631, 1969.
- [363] SCHILDE - RENTSCHLER L., A simpler method for the preparation of plant protoplasts, *Z. Naturforschg.*, **27b**: 208-209, 1972.
- [364] SCHMITT C., KOPP M., HIRTH L., Aptitude de diverses souches de tissus de plantes cultivées in vitro à donner des protoplastes, *C.R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **272**: 2447-2450, 1971.
- [365] SCHWEIZER D., Differential staining of plant chromosomes with Giemsa, *Chromosoma*, **40**: 307-320, 1973.
- [366] SCOWCROFT W. R., DAVEY M. R., POWER J. B., Crown - gall protoplasts; isolation, culture and ultrastructure, *Plant. Sci. Lett.*, **1**: 451-456, 1973.
- [367] SEYER P., MARTY D., LESCURE A. M., PEAUD - LENOEL P., Effect of cytokinin on chloroplast cyclic differentiation, *Cell Different.*, **4**: 187-197, 1975.
- [368] SHARP W. R., RASKIN R. S., SOMMER H. E., The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato, *Planta*, **104**: 357-361, 1972.
- [369] — Haploids in *Lilium*, *Phytomorphology*, **21**: 334-337, 1972.
- [370] SHARP W. R., CALDAS L. S., CROCOMO O. J., MONACO L. C., CARVALHO A., Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy level and subsequent morphogenesis, *Phyton*, **31**: 67-74, 1973.
- [371] SHUMWAY L. K., HESS W. M., Ultrastructural changes in white and green tobacco leaf protoplasts during dedifferentiation and colony formation, *Plant Physiol., suppl.*, **56**: 38, 1975.
- [372] SIDEBOTTOM E., Heterokaryons and their uses in studies of nuclear function, [w] *The Cell Nucleus*, red. H. Busch, Academic Press, New York 1974, 439-469.
- [373] SINISCALCO M., Somatic cell hybrids as tools for genetic studies in man, [w] *Control Mechanisms in the Expression of Cellular Phenotypes*, red. H.A. Padykula, Academic Press, New York 1970, 205-231.
- [374] SISKEN J. E., STEVENS E. E., DONELLY M., Effects of p - DL - fluorophenylalanine on mitosis and the mitotic spindle, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 25-32, 1972.
- [375] SISKEN J. E., The effects of p - DL - fluorophenylalanine on chromosome movement and cytokinesis of human amnion cells in culture, *Chromosoma*, **44**: 91-98, 1973.
- [376] SKENE K. G. M., Culture of protoplasts from grape vine pericarp callus, *Austr. J. Pl. Physiol.*, **1**: 371-376, 1974.
- [377] SMITH H. H., Model genetic system for studying mutation, differentiation and somatic cell hybridization in plants, [w] *Polyploids and Induced Mutations in Plant Breeding*, IAEA, Vienna 1974, 355-365.

- [378] SOPORY S. K., MAHESHWARI S. C., Production of haploid embryos by anther culture technique in *Datura innoxia*; a further study, *Phytomorphology*, **22**: 87-90, 1972.
- [379] — In vitro production of plants from the anthers of *Petunia hybrida* Vilmour, *Curr. Sci.*, **42**: 247-248, 1973.
- [380] — Similar effects of iron - chelating agents and cytokinins on the production of haploid embryos from the pollen grains of *Datura innoxia*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 97-99, 1973.
- [381] STEWARD F. C., AMMIRATO P. V., MAPES M. O., Growth and development of totipotent cells, *Ann. Bot.*, **34**: 761-787, 1970.
- [382] STOLARZ A., Indukcja androgenezy w ziarnach pyłkowych *Secale cereale* cv. Strzękocińskie Jare w warunkach in vitro, *Hod. Rośl. Aklim. Nasien.*, **18**: 217-220, 1974.
- [383] SUCHANOW W. M., KŁOCZKOW W. P., CHOCHŁOW S. S., Połączenie androklinnych gaploidów *Capsicum annuum* L. i *Nicotiana tabacum* L., *Dokł. AN SSSR*, **211**: 705-706, 1973.
- [384] SUN C., WANG C., CHU C., Cytological studies on the androgenesis of *Triticale*, *Acta Bot. Sinica*, **15**: 163-173, 1973.
- [385] — Cell division and differentiation of pollen grains in *Triticale* anthers cultured in vitro, *Scientia Sinica*, **17**: 47-51, 1974.
- [386] — The ultrastructure of plastids in the albino pollen plants of rice, *Scientia Sinica*, **17**: 793-797, 1974.
- [387] SUNDERLAND N., WICKS F. M., Cultivation of haploid plants from tobacco pollen, *Nature*, **224**: 1227-1229, 1969.
- [388] SUNDERLAND N., Anther culture — a progress report, *Sci. Progr.*, **59**: 527-549, 1971.
- [389] SUNDERLAND N., WICKS F. M., Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*, *J. Exp. Bot.*, **22**: 213-226, 1971.
- [390] SUNDERLAND N., Pollen and anther culture, [w] *Plant Tissue and Cell Culture*, red. H. E. Street, Blackwell, Oxford 1973, 205-239.
- [391] SUNDERLAND N., COLLINS G. B., DUNWELL J. M., The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis, *Planta*, **117**: 227-241, 1974.
- [392] SUNDERLAND N., DUNWELL J. M., Pathways in pollen embryogenesis, [w] *Tissue Culture and Plant Science*, red. H. E. Street, Academic Press, New York 1974, 141-167.
- [393] SUNG Z. R., Auxin-independent growth in a carrot cell line resistant to DL - 5 - methyltryptophan, *Plant Physiol.*, suppl., **56**: 37, 1975.
- [394] SWAMY R. D., CHACKO E. K., Induction of plantlets and callus from anthers of *Petunia axillaris* (Lam.) B.S.P. cultured in vitro, *Hort. Res.*, **13**: 41-44, 1973.
- [395] SZASKOLSKA N. D., SACHAROWSKA G. N., SACHAROWA E. W., The optimal conditions for isolation and incubation of barley mesophyll protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 93-98.
- [396] TAIZ L., JONES R. L., The isolation of barley - aleurone protoplasts, *Planta*, **101**: 95-100, 1971.
- [397] TAKEBE I., OTSUKI Y., AOKI S., Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state, *Pl. Cell Physiol.*, **9**: 115-124, 1968.
- [398] TAKEBE I., OTSUKI Y., Infection of tobacco mesophyll protoplasts by TMV, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**: 843-848, 1969.



- [399] TAKEBE I., LABIB G., MELCHERS G., Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco, *Naturwiss.*, **58**: 318-320, 1971.
- [400] TAKEBE I., NAGATA T., Culture of isolated tobacco mesophyll protoplasts, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 175-183.
- [401] TAKEBE I., OTSUKI Y., HONDA Y., NISHIO T., MATSUI C., Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco, *Planta*, **113**: 21-27, 1973.
- [402] TANAKA M., NAGATA K., Tobacco plants obtained by anther culture and the experiment to get diploid seeds from haploids, *Japan J. Genet.*, **44**: 47-54, 1969.
- [403] TANAKA M., The effect of centrifugal treatment on the emergence of plantlets from cultured anthers of tobacco, *HIS*, **8**: 8, 1973.
- [404] THOMAS T. P., THOMAS H., Anthers culture, Report of the Welsh Plant Breeding Station for 1971, 1972, 68-71.
- [405] THOMAS E., WENZEL G., Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **74**: 77-81, 1975.
- [406] — Embryogenesis from microspores of rye, *Naturwiss.*, **62**: 40-41, 1975.
- [407] UCHIMYA H., MURASHIGE T., Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells, *Plant Physiol.*, **54**: 936-944, 1974.
- [408] UMETSU N., OJIMA K., MATSUDA K., Enhancement of cell separation by colchicine in cell suspension cultures of soybean, *Planta*, **125**: 197-200, 1975.
- [409] USUI H., MAEDA M., ITO M., High frequency of spontaneous fusion in protoplasts from various plant tissues, *Bot. Mag.*, **87**: 179-182, 1974.
- [410] VARDI A., SPIEGEL - ROY P., GLAUN E., Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos, *Plant Sci. Lett.*, **4**: 231-236, 1975.
- [411] VASIL I. K., VASIL V., Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures, *In Vitro*, **8**: 117-127, 1972.
- [412] — Growth, and cell division in isolated plant protoplasts in microchambers, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 139-149.
- [413] — Regeneration of tobacco and petunia plants from protoplasts and culture of corn protoplasts, *In Vitro*, **10**: 87-91, 1974.
- [414] VASIL I. K., VASIL V., SUTTON W. D., GILES K. L., Protoplasts as tools for the genetic modification of plants, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 82.
- [415] VAZART B., Infrastructure de microspores de *Nicotiana tabacum* L. susceptibles de se développer en embryoïdes après excision et mise en culture des anthères, *C. R. Acad. Sci., Paris, Sér. D*, **272**: 549-552, 1971.
- [416] — Formation d'embryoïdes à partir de microspores de tabac: evolution de l'infrastructure des cellules au cours de la première semaine de culture des anthères, *C. R. Acad. Sci., Paris, Sér. D*, **272**: 549-552, 1971.
- [417] VYSKOT B., NOVAK F. J., Experimental androgenesis in vitro in *Nicotiana clevelandii* Gray and *N. sanderae* hort., *Theor. Appl. Genet.*, **44**: 138-140, 1974.
- [418] VYSKOT B., NOVAK F. J., HAVRANEK P., A genetic analysis at the level of haploid sporophytes of *Nicotiana tabacum* L., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **72**: 245-251, 1974.

- [419] WAGNER G., HESS D., Haploide, diploide und triploide Pflanzen von *Petunia hybrida* aus Pollenkörnern, Z. Pflanzenphysiol., **73**: 273-276, 1974.
- [420] WAKASA K., Isolation of protoplasts from various plant organs, Japan J. Genet., **48**: 279-289, 1973.
- [421] WALLIN A., ERIKSSON T., Protoplast cultures from cell suspensions of *Daucus carota*, Physiol. Plant., **28**: 33-39, 1973.
- [422] — Plating of protoplasts from cell suspension cultures of *Daucus carota*, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 301-307.
- [423] WALLIN A., GLIMELIUS K., ERIKSSON T., The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol, Z. Pflanzenphysiol., **74**: 64-80, 1974.
- [424] WANG C., CHU C., SUN C., WU S., The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured in vitro, Scientia Sinica, **16**: 218-222, 1973.
- [425] WANG Y., CUN C., WANG C., CHIEN N., The induction of the pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annum* from anther culture, Scientia Sinica, **16**: 147-151, 1973.
- [426] WANG C., SUN C., CHU Z., On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction, Acta Bot. Sinica, **16**: 43-53, 1974.
- [427] WATTS J. W., KING J. M., A method for preparation of plant protoplasts, Z. Naturforschg., **28c**: 231-236, 1973.
- [428] — The metabolism of proteins and nucleic acids in freshly isolated protoplasts, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 119-122.
- [429] WENZEL G., Isolation of leaf protoplasts from haploid plants of petunia, rye and rape, Z. Pflanzenzüchtg., **69**: 58-61, 1973.
- [430] WENZEL G., THOMAS E., Observations on the growth in culture of anthers of *Secale cereale*, Z. Pflanzenzüchtg., **72**: 89-94, 1974.
- [431] WHEATLEY D. N., HENDERSON J. Y., P - fluorophenylalanine and division related proteins, Nature, **247**: 281-283, 1974.
- [432] WHITE P. R., The cultivation of animal and plant cells, Ronald Press, New York, 1963.
- [433] WILDHOLM J. M., Tryptophan biosynthesis in *Nicotiana tabacum* and *Daucus carota* cell cultures: site of action of inhibitory tryptophan analogs, Biochim., Biophys. Acta, **261**: 44-51, 1972.
- [434] — Cultured *N. tabacum* cells with an altered anthranilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition, Biochim. Biophys. Acta, **261**: 52-58, 1972.
- [435] — Anthranilate syntetase from 5 - methyltryptophan susceptible and resistant cultured *Daucus carota* cells, Biochim. Biophys. Acta, **279**: 48-57, 1972.
- [436] — Cultured carrot cell mutants: 5 - methyltryptophan - resistance trait carried from cell to plant and back, Plant Sci. Lett., **3**: 323-330, 1974.
- [437] — Selection and characteristics of biochemical mutants of cultured plant cells, [w] Tissue Culture and Plant Science, red. H. E. Street, Academic Press, London 1974, 287-299.
- [438] WILLISON J. H. M., Fine structural changes occurring during the culture of isolated tomato fruit protoplasts, [w] Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 215-241.

- [439] WILLISON J. H. M., COCKING E. C., Interactions at the surface of plant cell protoplasts: an electrophoretic and freeze-etch study, *J. Bioenerg.*, **4**: 311-328, 1973.
- [440] WILLISON J. H. M., Synthesis of cell walls by higher plant protoplasts, IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts, Nottingham 1975, 36.
- [441] WILLISON J. H. M., COCKING E. C., Microfibrill synthesis at the surfaces of isolated tobacco mesophyll protoplasts; a freeze-etch study, *Protoplasma*, **84**: 147-160, 1975.
- [442] WITHERS L. A., POWER J. B., COCKING E. C., A study of the fusion of highly vacuolated plant protoplasts, *Biochem. J.*, **124**: 47p, 1971.
- [443] WITHERS L. A., COCKING E. C., Fine structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts, *J. Cell Sci.*, **11**: 59-75, 1972.
- [444] WITHERS L. A., Plant protoplast fusion: methods and mechanisms, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 517-545.
- [445] YAMADA Y., NAKAMINAMI M., The isolation and fusion of protoplasts from alkaloid plant cells cultured in vitro, [w] *Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Végétales*, Colloq. intern. C.N.R.S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris 1973, 373-383.
- [446] ZAITLIN M., BEACHY R. N., Protoplasts and separated cells: some new vistas for plant virology, [w] *Tissue Culture and Plant Science*, red. H. E. Street, Academic Press, London 1974, 265-285.
- [447] ZENKTELER M., In vitro production of haploid plants from pollen grains of *Atropa belladonna* L., *Experientia*, **27**: 1087, 1971.
- [448] — Development of embryos and seedlings from pollen grains in *Lycium halmifolium* Mill. in the in vitro culture, *Biol. Plantarum*, **14**: 420-422, 1972.
- [449] — In vitro development of embryos and seedlings from pollen grains of *Solanum dulcamara*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 189-192, 1973.
- [450] ZENKTELER M., MISIURA E., Induction of androgenic embryos from cultured anthers of *Hordeum*, *Secale* and *Festuca*, *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **165**: 337-340, 1974.
- [451] ZENKTELER M., MISIURA E., PONITKA A., Induction of androgenetic embryoids in the in vitro cultured anthers of several species, *Experientia*, **31**: 289-301, 1975.

Otrzymano: 22 grudnia 1975.

Przyjęto: 20 stycznia 1976.

Adres autorki: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 05 - 870 Radzików.



---

## LECTINS AS MOLECULAR PROBES IN MORPHOLOGICAL INVESTIGATIONS ON ARCHITECTURE AND DYNAMICS OF CELL SURFACES

Jürgen ROTH

Institute of Pathology, Friedrich - Schiller - University  
Jena, DDR - 69 Jena, German Democratic Republic

*Summary.* The cell surface glycocomponents seem to play an important role in the regulation of growth, development and communication of animal cells. At present the situation is characterized by the growing use of lectins as molecular probes for elucidation of the structure and dynamics of the cell surface. Lectins are antibody - like proteins or glycoproteins of plant origin which can react reversibly with certain sugar residues. For use in membrane research it is desirable to utilize highly purified lectins. A comprehensive survey is given on the techniques for purification of lectins with different sugar specificity. Furthermore, the structure and biological properties of some representative lectins are reported. The various electron - microscopic techniques for visualization of lectin receptors with respect to their advantages and disadvantages are described.

### INTRODUCTION

During the last years numerous experimental data point to the cell surface as the primary site for control and regulation of basic cellular properties such as cell growth, cell division, cell development, cellular communication, cell differentiation and cellular recognition. Furthermore, structural and functional changes in the cell surface have been suggested to accompany the process of transformation of normal cells to malignant cells and their property for infiltrative and metastatic growth. Cell surface changes associated with malignancy include for example varying changes in glycosaminoglycans, glycolipids, membrane proteins and lipids and enzyme activities as well as an increase in mobility of some membrane components and an enhanced cell agglutinability by lectins. The numerous and new facts on the structure and function

of the cell surface partially result from improvement of the conventional and development of new electron-microscopic techniques and their combination with ultrahistochemical labeling procedures, covalent labeling of cell surface molecules as well as electron spin-resonance spectroscopy. Lectins, a class of plant proteins or glycoproteins which bind to specific sequences in oligosaccharides of cellular and extracellular glycopeptides possess many important biological properties. For example they can stimulate cells to mitosis, affect cell transport systems, act like hormones, inhibit cell growth and movement, induce histamine secretion and others. During the last few years lectins have been introduced in membrane research as specific molecular probes for studying the number, arrangement, mobility and turnover of the corresponding lectin receptors which represent glycoproteins and probably glycolipids. At present the situation is characterized by the growing use of lectins in investigating the architecture and dynamics of cell surfaces and in elucidating the changes which cells undergo following transformation as well as in isolating of specific cellular and other glycocomponents.

In this review I shall describe some aspects of the normal and neoplastic cell surface obtained by use of lectins. These include some comments on the physical, chemical and biological properties of lectins as well as on the development of electron-microscopic techniques for visualization of certain lectin receptors and their use in the study of the architecture and dynamics of the normal and neoplastic cell surface.

It is, of course, not possible to give a complete survey of the complex field of membrane research and related problems. The reader is urged to consult other relevant reviews as given recently by Sharon and Lis [171], Burger [32], Lis and Sharon [102], Nicolson [126], Rapin and Burger [150], Nicolson [131] and Robbins and Nicolson [154].

## LECTINS AS MOLECULES

### HISTORICAL

Lectins [27] (also named phytoagglutinins, phytohemagglutinins, plant agglutinins, hemagglutinins) represent a wide class of plant proteins or glycoproteins which possess important biological properties. At present lectins are undergoing a renaissance owing to their extensive use in membrane research. However, lectins were discovered already 88 years ago by Stillmark [179, 180]. He prepared saline extracts from the beans of *Ricinus communis* and *Croton tiglium* and found that these toxic plant extracts agglutinated erythrocytes. In 1907 Landsteiner and Raubitschek [93] reported the isolation of non-toxic lectins from pea,

lentil a.o. The blood - group specific lectins were isolated for the first time by Boyd [26] and Renkonen [152]. However, the majority of lectins are non specific with regard to blood groups. Beside their classical use in clinical blood typing lectins have proved to be very useful in analysis of cell surfaces of normal and neoplastic cells [126].

Although lectins have been detected in extracts obtained from hundreds of plant species and from numerous species of invertebrates [102] only a small number of lectins have been isolated in purified form. It is however, absolutely necessary to use highly purified lectins in membrane research.

#### PURIFICATION OF LECTINS

Lectins can be purified from saline extracts of plants by conventional techniques for protein purification such as salt precipitation, gel chromatography, ion exchange chromatography and others. However, the most promising technique is affinity chromatography, by means of carbohydrate polymers as adsorbent, developed on the basis of the specific binding properties of lectins. The bound lectin can be removed from the affinity column either by adding the specific hapten to the elution buffer [3, 4] or by the use of an elution buffer of low pH [138]. In rare cases glutaraldehyde fixed erythrocyte membranes [17] or formalinised erythrocytes [151] were used as general affinity adsorbent instead of Sephadex or Sepharose. A further general purification procedure is based on the use of the commercial gels to which a variety of acceptors for lectins can be chemically coupled. These affinity techniques possess many advantages in comparison with the conventional procedures. They represent small - step procedures with high effectivity under mild preparation conditions. The first lectin that was purified in crystalline form was Concanavalin A from the jack bean (*Canavalia ensiformis*).

Today it can be easily purified on a Sephadex gel by affinity chromatography [3, 4], instead of the originally described isolation and crystallization procedure of Summer and Howell [182]. The procedure depends on the ability of Concanavalin A to form precipitates with dextrans and involves the saline extraction of jack bean meal, concentration of the extract by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and adsorption of lectin on a cross - linked dextran like Sephadex G - 50. Inert proteins are eluted by washing the column with 1 M NaCl. By addition of a 0.1 M solution of glucose to the NaCl solution Concanavalin A is eluted. The glucose can be removed from Concanavalin A by dialysis or gel filtration. The purified Concanavalin A can be stored in 1 M NaCl at  $+4^\circ\text{C}$  or in freeze - dried form.

Other lectins with somewhat similar sugar specificity can also be purified on Sephadex as the *Lens culinaris* lectin [42, 73]. Two closely related proteins with agglutinating activity have been isolated from this plant. They were called LcH - A and LcH - B. The purification of the two lectins consists in a two step process. First, a crude saline extract is prepared. The second step, which results in a mixture of the two lectins, can be performed in two ways: (a) either dialysis against distilled water followed by DEAE - cellulose chromatography [73] or (b) specific adsorption to Sephadex G - 100 and elution with D - glucose [42, 74]. Separation of LcH - A and LcH - B from the lectin mixture is done by CM - cellulose chromatography using a shallow salt gradient [74]. The *Lens culinaris* lectin can be stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or freeze - dried.

The group of galactose - specific lectins have been affinity - purified on agarose beads columns [127, 186]. As an example the procedure for the purification of the *Ricinus communis* lectin is described here. The *Ricinus communis* beans were extracted routinely in saline. After centrifugation of the crude extract the supernatant was adjusted to 0.6 saturation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The precipitate was dissolved in phosphate buffered saline and applied to a column of Sepharose 4B or Bio - Gel 4 - 0.5 m agarose. After removal of the unbound proteins, the lectins were eluted with 0.2 M D - galactose or 0.2 M  $\beta$ -lactose. The lectins were easily separated on a Sephadex G - 100, Bio - Gel - P100 or P150 column by elution with phosphate buffered saline. The first protein peak corresponded to a protein of molecular weight 120 000, whereas the second corresponded to a protein of molecular weight 60 000.

Using similar procedures, agarose gels have been used to purify lectins from *Semen jequiriti* [135], *Abrus precatorius* [137, 186], *Momordia chorantia* [186], *Pseudomonas aeruginosa* [50], *Wistaria floribunda* [188] *Bauhinia purpurea alba* [80], *Dictyostelium discoideum* [157] and *Polysphondylium pallidum* [158]. Interestingly, not all lectins that are specific for D - galactose can be purified on Sepharose columns. The lectins from *Crotolaria juncea* cannot interact with internal residues of the linear galactan chains of Sepharose [43]. Adsorption of this lectin was made possible after a mild acid hydrolysis of Sepharose resulting in an increase in the galactosyl end group. Purification of the lectin from *Sophora japonica* by Sepharose is not possible because of its reactivity towards  $\alpha$  - D - galactose.

For purification of lectins for which no ready - made adsorbents are available, appropriate affinity columns can be prepared by covalent coupling of specific residues to a supporting matrix [103]. Various synthetic derivatives of specific sugars (for example N - ( $\alpha$  - amino - caproyl) -



$\beta$ -glycosylamine of L-fucose or 6-aminohexyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside) were reacted with cyanogen bromide-activated Sepharose for purification of wheat germ agglutinin [106], *Lotus tetragonolobus* lectin [25] and soy bean lectin [57]. Matsumoto and Osa-wa [117] used epichlorhydrin for coupling L-fucose to starch. Hayes and Goldstein [69] isolated the lectin from *Bandeiraea simplicifolia*. They prepared an affinity column by oxidizing melobiose to melobionic acid, and then coupling it to aminoethyl acrylamide, using a water-soluble carbodiimide.

Beside mono- and oligosaccharides various glycoproteins can be coupled to an insoluble support for purification of the lectins from *Dolichus biflorus* [44], *Helix pomatia* [64], lima bean [48], *Sophora japonica* [145], *Vicia cracca* [182a], *Phaseolus vulgaris* [117], wheat germ [24, 30, 96], *Maackia amurensis* [90], rabbit liver [75] and *Limulus polyphemus* [139, 155, 156].

A further possibility for affinity chromatography of lectins is based on the fact that many lectins are mannose-containing glycoproteins which can be adsorbed on a column of Sepharose-bound Con A [23].

#### STRUCTURE AND PROPERTIES OF PURIFIED LECTINS

The last years have witnessed a marked increase in the number of highly purified lectins whose chemical, physical and biological characteristics have been investigated. Because of limitations of space only some representative lectins will be described here.

In general, lectins represent glycoproteins with the exception of Concanavalin A, which is devoid of sugar residues and is, therefore, a protein. A further characteristic of the lectins is their content of metal ions which are inevitable for the sugar-binding and agglutinating activities of lectins.

1. Concanavalin A. Concanavalin A is the most extensively investigated lectin and a voluminous literature has been published in the last several years. Concanavalin A agglutinates erythrocytes and other types of cells from different animal and bacterial species [126]. It has been shown to interact with biopolymers containing multiple terminal non-reducing and internal 2-O-linked  $\alpha$ -D-glucopyranosyl, (or its 2-acetamido-2-deoxy derivative),  $\alpha$ -D-mannopyranosyl or  $\beta$ -D-fructofuranosyl residues [54, 55, 174, 175, 204]. These include polysaccharides such as glycogens [182], dextrans [51, 52],  $\alpha$ -mannans [176, 182], fructans [51], pneumococcal polysaccharides [176], immunoglobulins [53], blood group substances [104], lipopolysaccharides [84], teichoic acid [88] and other lectins [53]. Goldstein et al. [52] suggest that unmodified hydroxyl

groups at C - 3, C - 4 and C - 6 of the D - arabino - hexopyranosyl configuration may represent the minimum structural features required for saccharide binding to Concanavalin A. In order to bind sugars Concanavalin A requires certain divalent cations. Transition metal ions are inevitable for the binding of  $\text{Ca}^{++}$ , and both are necessary for the binding of saccharides.

Crystalline Concanavalin A can be separated into several molecular species which include at least two forms [1, 198]. One of them is made up of a single subunit species or "protomer" of molecular weight 27,000 ( $\alpha$ ) which consists of a single polypeptide chain. Two further polypeptide chains correspond to molecular weights of approximately 16,000 ( $\beta_1$ ) and 13,000 ( $\beta_2$ ). Since Concanavalin A has been reported to have a molecular weight of 55,000 at pH around 5 [87] the subunit structures possible for this protein may be the following three: ( $\alpha$ )<sub>2</sub>; ( $\alpha$ )<sub>1</sub>, ( $\beta_1$ )<sub>1</sub> ( $\beta_2$ )<sub>1</sub> and ( $\beta_1$ )<sub>2</sub> ( $\beta_2$ )<sub>2</sub>. Sedimentation equilibrium studies indicate that Concanavalin A exists as a 110,000 molecular weight tetramer at pH 7.0 and higher [87].

The structure of Concanavalin A as seen in the electron density map at 6.0, 4.25 and 3.0 Å clearly shows a tetrameric configuration composed of four protomer molecules with a molecular weight of about 108,000 [65]. In summary, Concanavalin A is composed of identical asymmetric subunits (protomers) arranged in dimers, tetramers and higher forms depending on the pH [41, 66, 118, 150a] and contains no  $\alpha$  - helical but approximately 50%  $\beta$  structures [91]. A dimer - tetramer transition of Concanavalin A can also occur if the temperature is lowered [58, 77, 119]. The dimer and tetramer configurations have significantly different binding affinities for sugars [118, 119]. Optical rotatory dispersion and circular dichroism studies revealed that between pH 5 and 7 Concanavalin A undergoes a conformational transition which involves a slight loss of the  $\beta$  - structure but no perturbation of aromatic residues [169]. The saccharide binding site of Concanavalin A, determined by x - ray methods using O - iodophenyl -  $\beta$  - D - glucopyranoside for substrate, is proposed to be a  $6 \times 7,5 \times 18$  Å pocket located on each subunit [18, 41]. The structure of the myo - inositol binding site of Concanavalin A, determined from a difference Fourier map of the saccharide - lectin complex, appears as a cavity and is formed entirely of the polypeptide chain of one subunit [67]. The largest opening from the surface to the inositol position is approximately  $4 \times 6$  Å. Through this opening, the centre of the inositol ring sits about 8 Å from the molecular surface. The distance between the saccharide and the transition metal binding sites, as determined by x - ray analysis, was reported to be about 20 Å [18]. Investigations of the solution structure of Concanavalin A using

$^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance or  $^{19}\text{F}$  nuclear magnetic resonance and the probe molecule methyl - D - glucopyranoside or N - trifluoroacetylglucosamine indicate a much smaller separation of saccharide and metal-binding sites [10, 192]. Recently, Hardman and Ainsworth [68] have suggested that Concanavalin A has two types of organic molecule binding sites. One is a general hydrophobic molecule-binding site and the other is a specific saccharide binding site.

In consequence, Concanavalin A has been used as reagent in analytical and preparative biochemistry. For example, human gastric juice was found to contain at least two vitamin  $\text{B}_{12}$ -binding substances [199]. One of the proteins was found to bind to a column of Con A - Sepharose. Since it was absent in the gastric juice of pernicious anemia patients, it was concluded that this protein was the intrinsic factor. Wiedmer et al. [200] present evidence that acetylcholinesterases from human erythrocytes, the electric organ of *Electrophorus electricus* and from plaice body muscle are bound by Con A - Sepharose, thus indicating the glycoprotein nature of these enzymes. Dopamine -  $\beta$  - hydroxylase, a glycoprotein, was found to interact strongly with Concanavalin A [197]. The enzyme is catalytically active when it is immobilized on a Con A - Sepharose column. It was concluded that the active site of the enzyme is not near the point of carbohydrate attachment of the molecule and that this may be of significance in orienting the enzyme on the membrane of the adrenal chromaffin granules. On the other hand, Concanavalin A causes a specific and reversible inhibition of ecto - 5' - nucleotidase of intact cultured C6 glioma cells [177]. The liver cell membrane enzyme 5' - nucleotidase is stimulated at low concentrations of Concanavalin A whereas high concentrations of Concanavalin A result in an inhibition [153]. The two phases probably result from occupation of different binding sites. However, it is still unresolved whether the modifications of 5' - nucleotidase activity were due to general perturbations of carbohydrate moieties or specifically to the binding of Concanavalin A to mannose residues.

A Concanavalin A - Sepharose column was used for fractionation and characterization of synaptosomal plasma membrane glycoproteins [208, 209], for the study of glycoproteins of liver microsomal membranes [201], for isolation of right side - out vesicles of purified plasma membranes from various cells [207] and others. Furthermore, Concanavalin A interacts with various viruses [83, 133, 142].

Concanavalin A possesses some important biological properties. For example, it can release histamine from human leucocytes [71], it can inhibit the interferon action [22] and thromboplastin activity [206], it mimics hormone action [37, 38], it stimulates mitosis [11, 120] and pla-

telet release [61] and it acts as an immunosuppressive agent [94, 114, 132].

2. Wheat germ agglutinin. Aub et al. [12, 13, 14] first reported that crude wheat germ lipase preparations agglutinated certain tumor cells. The isolation and purification of the agglutinating principle was performed by Burger and Goldberg [31]. In the mean time more efficient purification procedures have been developed as described in chapter 2.2. Although originally suggested as a glycoprotein [31] the most recent reports indicate that the lectin is carbohydrate free [9, 109, 121, 122]. The amino acid composition is characterized by an unusually high cysteine and glycine content [9, 122]. Molecular weight estimates vary from 17,000 to 35,000, this corresponding to a pH dependent monomer-dimer transition of wheat germ agglutinin [122]. The lower molecular weight corresponds to that of one subunit composed of a polypeptide chain of  $165 \pm 12$  amino acid residues [122].

Wheat germ agglutinin interacts with biopolymers containing N - acetyl - D - glucosamine or a closely related derivative [31]. Allen et al. [9] demonstrated that only derivatives of D - glucose with a 2 - acetamido group and a free hydroxyl group at position 3 were effective. Furthermore, it could be shown that oligosaccharides were more effective inhibitors than monosaccharides. Equilibrium dialysis studies suggested that wheat germ agglutinin has binding sites for sialic acid [60].

Le Vine et al. [96] reported that wheat germ agglutinin has one sugar binding site per 23,000 g of the protein. The same conclusion was also deduced from fluorescence experiments in the case of  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) linked oligomers of N - acetyl - D - glucosamine [107]. Recently, Nagata and Burger [122] and Privat et al. [147, 146] reported that wheat germ agglutinin has two independent sugar binding sites per mole under conditions where it is known that the wheat germ agglutinin is in its monomeric form. It can therefore be concluded that the wheat germ agglutinin monomer has two independent binding sites for N - acetyl - D - glucosamine and its  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) linked oligomer.

Recent fluorescence studies on saccharide binding to wheat germ agglutinin decided that the binding site is large and contains, at least, three subsites which bind N - acetyl - D - glucosamine residues [148]. In order to bind sugar, wheat germ agglutinin required no divalent cations [122]. Privat et al. [148] emphasize the importance of free carboxylic groups in the binding of lectins to their specific ligands. X - ray crystallographic studies of the three dimensional structure of wheat germ agglutinin have been begun. Wright et al. [203] found that the

wheat germ agglutinin crystals form a unit cell with eight molecules (subunits) in it.

Similarly to other lectins, wheat germ agglutinin was found to agglutinate bacterial cells and cell wall polymers [111]. From these experiments and other ones [2] it was concluded that secondary non-specific interactions contribute to the binding of lectin to the polymers. However, secondary interactions are not sufficient by themselves to cause precipitation in the presence of potent wheat germ agglutinin haptenic inhibitors. An further interesting property of wheat-germ agglutinin is its insulin-like activity [37]. At very low concentrations it can, like insulin, enhance the rate of glucose transport and inhibit lipolysis in isolated fat cells, and inhibit the activity of adenylate cyclase in isolated liver and fat cell membranes. It was suggested that the insulin-like activity of wheat germ agglutinin may result from direct interactions with the insulin receptor in a way closely resembling the interaction with insulin [35]. These studies indicate also that the insulin-binding macromolecules of liver and fat cell membranes are glycoproteins. It is of interest that the maximal effects of wheat-germ agglutinin occur at concentrations of 1 to 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  which result in the occupation of only a very small fraction of all the binding sites [36]. Affinity chromatography with WGA-Sepharose was used as an effective procedure for fractionating erythrocyte membrane glycoproteins. In this way erythrocyte membrane receptors for wheat germ agglutinin could be isolated [2] and were characterized as a component of the major sialoglycoprotein.

**3. *Ricinus communis* agglutinin.** Stillmark [179] first reported that a crude extract of *Ricinus communis* was toxic to mice and agglutinated erythrocytes. Recently, the lectins of *Ricinus communis* were purified by affinity chromatography [127, 186]. The castor beans contain at least two lectins. One of these has a molecular weight of 50,000 to 60,000 and has been called RcA 60, RcA<sub>I</sub>, ricin D or *Ricinus communis* toxin [63, 82, 85, 125, 135, 196]. The other lectin has a molecular weight of about 120,000 and has been called RcA<sub>120</sub>, RcA<sub>II</sub> or Ricin I [40, 125, 186, 195, 196]. The two lectins appear to be composed of one identical and one distinct type of subunit [127]. The RcA<sub>I</sub> consists of two major peptides of approximate molecular weight 29,500 and 37,000, respectively. The RcA<sub>II</sub> yielded peptides of approximate molecular weight 29,500 and 34,000, respectively. Nicolson et al. [127] proposed that RcA<sub>I</sub> is probably a tetramer of the  $\alpha_2\beta_2$  type and RcA<sub>II</sub> is a dimer of the  $\alpha\beta'$  type. RcA<sub>I</sub> and RcA<sub>II</sub> share a common type of peptide, the 29,500 molecular weight

peptide, because of the similar amino acid compositions, tryptic fingerprints, and pH and temperature stabilities [63, 127]. Saccharides with arrangement of hydroxyl groups at the C - 2, C - 3 and C - 4 positions similar to D - galactose are all strong inhibitors of RcA<sub>I</sub> and RcA<sub>II</sub> [125, 127, 191]. These findings are in agreement with the hemagglutination inhibition data of Drysdale et al. [40] and Pardoe et al. [140]. RcA<sub>I</sub> and RcA<sub>II</sub> were inhibited by saccharides containing terminal nonreducing D - galactose residues, but RcA<sub>II</sub> was additionally inhibited by N - acetyl - D - galactosamine [127]. RcA<sub>I</sub> preferred  $\alpha$  over  $\beta$  linkages, but RcA<sub>II</sub> was inhibited equally by saccharides with  $\alpha$  or  $\beta$  linkages.

Irimura et al. [81] investigated the carbohydrate binding specificities of various galactose - specific lectins by means of various glycopeptide hapten inhibitors. The authors suggested that galactose - specific lectins can be classified into three groups based on the type of sugar chains with which they primarily interact on the cell surface.

One of the most interesting properties of RcA<sub>II</sub> is its extreme toxicity [180]. Recently, Lin et al. [98, 99] and Olsner and Pihl [194, 135, 136] found that RcA<sub>II</sub> strongly suppresses cell protein synthesis by interfering with the completion of ribosome - bound initiated peptide chains. This process involves the binding of the RcA<sub>II</sub> to the cell surface receptors, followed by endocytosis and release of RcA<sub>II</sub> from inside endocytotic vesicles into the cytoplasm [128, 130]. Furthermore, lectins that interact with the galactose N - acetyl - D - galactosamine sugar sequence, i.e. *Ricinus communis* agglutinin stimulates human peripheral lymphocytes to mitosis [81]. Kishiye et al. [92] demonstrated an increased membrane fluidity on human peripheral lymphocytes appearing after binding of RcA<sub>I</sub> or RcA<sub>II</sub>. This may probably represent the initial step in the mitogenic stimulation.

4. *Lens culinaris* lectin. The common lentil, *Lens culinaris* or *Lens esculenta*, was first reported to contain a lectin by Landsteiner and Raubitschek [93]. Two isolectins, called LcH - A and LcH - B, were isolated by Ticha et al. [183] and by Howard et al. [74]. The latter described that each of the two lectins consists of two identical polypeptide chains of 24,500 molecular weight. Contrary to these findings Fliegerova et al. [47] reported two types of subunits differing in their molecular weights (18,000 and 8,000) as well as amino acid composition and terminal acids. It was suggested that these subunits (called H and L) form an oligomer consisting of 2H+2L. The molecular weight of such an oligomer would be 52,000 which is in good agreement with the values reported by Howard et al. [74]. The bivalent *Lens culinaris* lectin [178] reacted with D - mannose and D - glucose - containing polysaccharides

[42, 73, 205]. The *Lens culinaris* lectins contain  $Mn^{++}$  and  $Ca^{++}$  and take up additional  $Mn^{++}$  and  $Ca^{++}$  in solution with a concomitant strong increase in hemagglutinating activity [141]. The *Lens culinaris* lectin mixture is relatively heat stable [141], particularly in the presence of binding sugars. Lyophilization caused extensive denaturation of LcH - A [73]. In comparison with Concanavalin A which reacts with similar sugar residues, the LcH - A has a 50 - fold lower sugar binding constant [178]. This might explain why Concanavalin A gives visible precipitation with dextrans which give never such visible reaction with the *Lens culinaris* lectins [178].

5. Soy bean lectin. The lectin from *Glycine max* was first purified by Liener et al. [97] and is a glycoprotein [100]. The specificity of the purified lectin is attributable to terminal  $\alpha$  - linked 2 - acetamido - 2 - deoxy - 2 - D - galactopyranosyl or to  $\alpha$  - or  $\beta$  - galactopyranosyl residues [101, 143].

The molecular weight, determined by sedimentation equilibrium and by gel filtration, was found to be 120,000 to 122,000 [110]. It was concluded that the soy bean lectin is a tetramer composed of identical subunits, each of molecular weight 30,000 [110]. Two binding sites for N - acetyl - D - galactosamine were found in one molecule of 120,000 molecular weight. Cross - linking of soy bean lectin with glutaraldehyde results in an enhancement of its hemagglutinating and mitogenic activities [108]. A similar increase in hemagglutinating activity was observed upon storage in lyophilized state [111]. This phenomenon is caused by the formation of high molecular weight aggregates. Soy bean lectin retains its full biological activity after periodate oxidation followed by reduction with sodium  $^3H$  borohydride [112]. This shows that the integrity of the carbohydrate side chain of the lectin is not essential for the biological activity. On the other hand, further lectins which are glycoproteins and devoid of S - S and -SH groups can be radioactively labelled by this method.

#### STRUCTURE OF MEMBRANE LECTIN RECEPTORS

The assumption that the cell surface lectin receptors are sufficiently characterized by the structure of the best hapten inhibitor in cell agglutination or polysaccharide precipitation is an oversimplification. For characterization, the lectin receptors should be isolated from the cellular membranes. It should, however, be stated that not all of the isolated inhibitors are actual lectin receptors on the intact cell surface. The release of membrane glycocomponents can be achieved by the use of proteolytic enzymes, hypotonic shock or various detergents. This is

followed by purification of the receptors for example by affinity chromatography on lectin - Sepharose columns [2]. In this way receptors could be isolated from various cells for Concanavalin A [6, 7, 21, 33, 39, 79, 123, 170, 187], for *Lens culinaris* lectin [187], for wheat germ lectin [2, 123, 189] for *Ricinus communis* lectin [2, 81, 189], for *Agaricus bisporus* lectin [145a, 189], for *Robinia pseudoaccacia* lectin [39, 95], and others. These investigations clearly demonstrated that the various lectin receptors, in general, are represented by complex structures such as glycopeptides.

#### TECHNIQUES FOR ELECTRON MICROSCOPIC VISUALIZATION OF LECTIN RECEPTORS

As already described on p. 237 lectins are naturally occurring antibody - like substances of plant origin. They can reversibly react with terminal nonreducing (and internal) saccharide moieties in a way comparable to an antigen - antibody reaction. According to these properties and their protein or glycoprotein nature the lectins represent a new class of reagents for cytochemistry with a new high level of specificity. Avrameas [16] for the first time introduced lectins in cytochemistry for visualizing saccharide residues. Because of the insufficient inherent electron density of the lectin molecules they have been covalently coupled to electron dense markers or enzymes by modifications of the glutaraldehyde coupling procedure of Avrameas [15]. A further main improvement is represented by cytochemical affinity techniques without need for covalent linkage between the lectin and an appropriate marker.

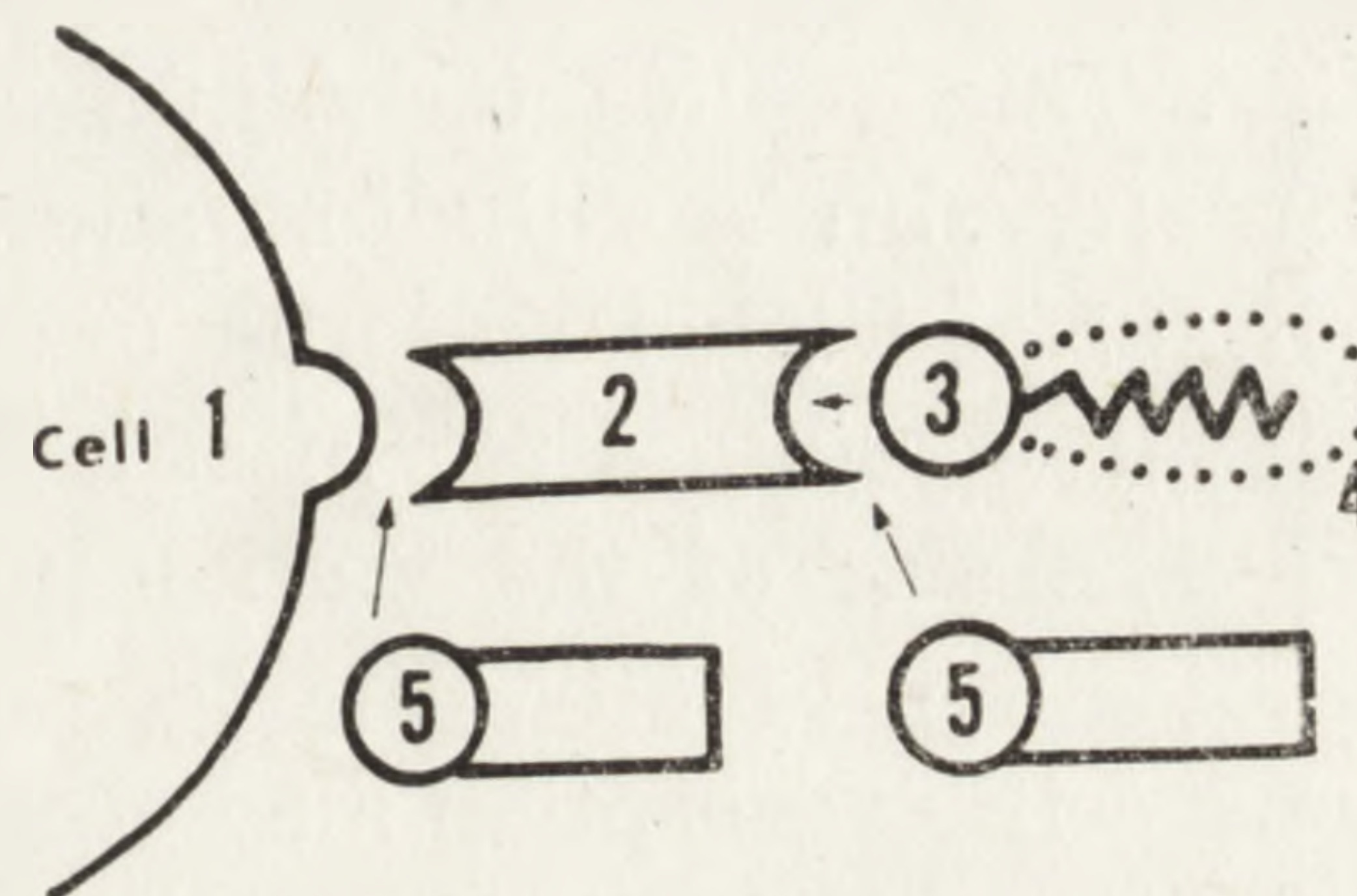
#### LECTIN AFFINITY TECHNIQUES

Bernhard and Avrameas [20] first used horseradish peroxidase for visualization of Concanavalin A receptors in the glycocalyx by means of a cytochemical affinity technique. Horseradish peroxidase does not need a special coupling procedure to form complexes with Concanavalin A. This enzyme is a glycoprotein containing approximately 18% saccharide residues among which the three saccharide residues for binding to the acceptor sites of the Concanavalin A molecules are present. The principle of the technique is illustrated in Fig. 1. The cells were incubated in Concanavalin A, which is fixed on the cell surface by the corresponding saccharide moieties. In a second incubation step horseradish peroxidase is added and becomes fixed on the still free sugar binding sites of the polyvalent lectin. The cells were then fixed with glutaraldehyde or formaldehyde as usual. This cell surface receptor — the



lectin - peroxidase complex is then revealed by the diamino bezidine reaction [59] leading to an osmiophilic precipitate. Controls for specificity of the technique usually contain 0.1 M or 0.2 M of the specific saccharide inhibitor ( $\alpha$  - methyl - D - mannopyranoside, D - mannose, D - glucose) in the incubation medium.

Fig. 1. Schematic representation of the Concanavalin A - peroxidase technique after Bernhard and Avrameas [20]. 1 — Cell with lectin receptor, 2 — Concanavalin A, 3 — horseradish peroxidase, 4 — DAB - reaction, 5 — hapten inhibitor



A further cytochemical affinity technique by means of horseradish peroxidase for binding to unoccupied binding sites of cell surface - bound lectins was described by Roth and Thoss [162] and Roth et al. [165].

Instead of Concanavalin A the *Lens culinaris* lectin with a sugar specificity directed towards D - mannose and D - glucose like residues was used. The cytochemical procedure corresponds to that described for the Concanavalin A - peroxidase technique.

Theoretically, horseradish peroxidase can be utilized for binding other mannose or glucose - specific lectins as the *Pisum sativum* lectin. Lectins with other sugar specificities for example *Ricinus communis* agglutinin with a binding specificity for  $\beta$  - D - galactose like sites cannot be revealed by this technique.

The cytochemical affinity techniques using horseradish peroxidase are uncomplicated and highly reliable. However, the reagents which were used were not covalently coupled. Therefore, the possibility of a loss of biological activity of lectin is avoided. On the other hand, this fact involves several problems. Some lectin and/or peroxidase loss by spontaneous release from the cell surfaces or during the rinsing steps can occur [78]. Furthermore, differences in binding of peroxidase to receptor - lectin complexes are possible, obviously in relation to the number of free lectin sugar binding sites [34, 78]. The final electron dense reaction product is a limiting factor for the resolution in the electron microscope.

Another cytochemical affinity technique for demonstration of cell surface - bound Concanavalin A was developed by Smith and Revel [173]. Instead of horseradish peroxidase hemocyanin from *Bucyon canaliculata* was used as marker by virtue of the fact that it possesses the appropriate

carbohydrate sequences for lectin binding. The distinctive size and cylindrical shape of this marker renders it identifiable in thin sections [89, 185, 190] as well as in platinum - carbon replicas [173]. The labeling procedure of cells is similar to that described for the Concanavalin A - peroxidase technique including a Concanavalin A incubation step followed by hemocyanin incubation. After fixation and dehydration of the labeled cells a shadowcast replica can be made at a 45° angle onto cover slips. This replica technique allows a two dimensional visualization of Concanavalin A - binding sites. However, the correlation between the cell surface label and the underlying cytoplasm cannot be investigated as it is possible after in situ embedding and sectioning of cells.

The size of the marker molecules is a strong limitation for exact localization. Finally, the technique is not a quantitative one [173] and nonspecific adsorption may occur.

An entirely new affinity technique has been developed by Martin and Spicer [115] and by Roth and Franz [163] by the use of polysaccharide - iron complexes for visualization of membrane receptor - bound lectins. The principle of the technique is illustrated in Fig. 5. Franz and Roth [45] synthesized a mannan - iron complex for specific binding to Concanavalin A or *Lens culinaris* lectin, whereas Martin and Spicer [115] used a commercial dextran - iron complex. These polysaccharide - iron complexes exhibit two properties simultaneously: binding to lectin by their carbohydrate content as well as high electron density owing to their iron core. In this manner they represent both a receptor and a marker substance. In the meantime other polysaccharide - iron complexes for demonstration of galactose - specific lectins were prepared by us [46, 164].

#### LECTIN-FERRITIN CONJUGATES

Nicolson and Singer [124] first used a modification of the glutaraldehyde coupling procedures of Avrameas [15] for preparation of covalently linked Concanavalin A - ferritin. Stobo and Rosenthal [181] improved the effectivity of the coupling procedure by adding the saccharide inhibitor for protection of the sugar binding site of Concanavalin A molecules during the coupling procedure. After conjugate preparation the hapten can be removed easily by dialysis. In the meantime various lectins have been covalently coupled to ferritin [70, 165, 168, 184]. Generally, the coupling procedure by glutaraldehyde resulted in a mixture of free ferritin and lectin, lectin - ferritin conjugates and polymers of ferritin and lectin. In consequence, a purification of the reaction product must be performed by gel filtration on Sepharose 4 B, followed by affinity chromatography [129]. Another possibility for con-

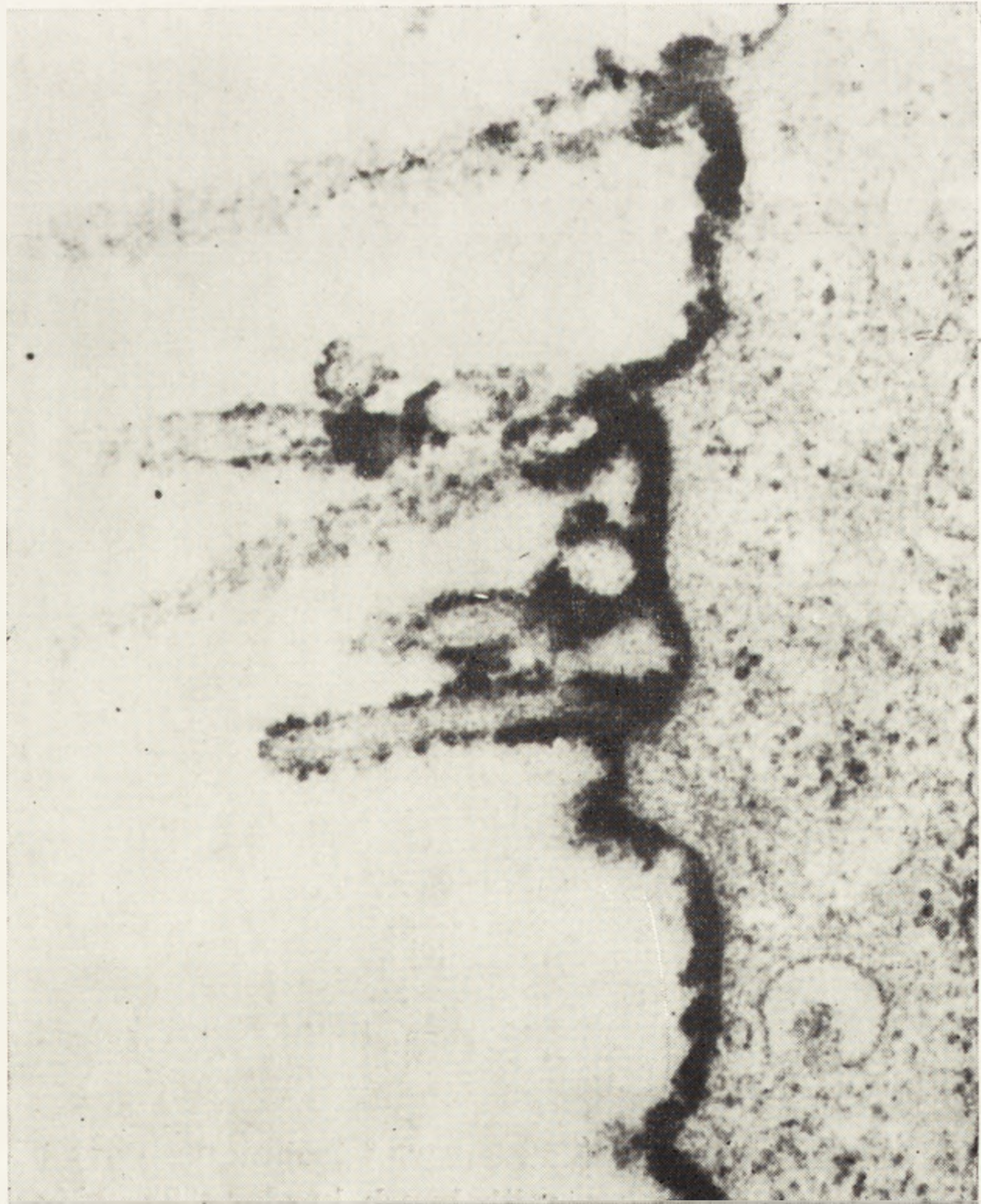


Fig. 2. Concanavalin A - peroxidase technique on normal rat liver cell culture in vivo and in situ. 60,000 X

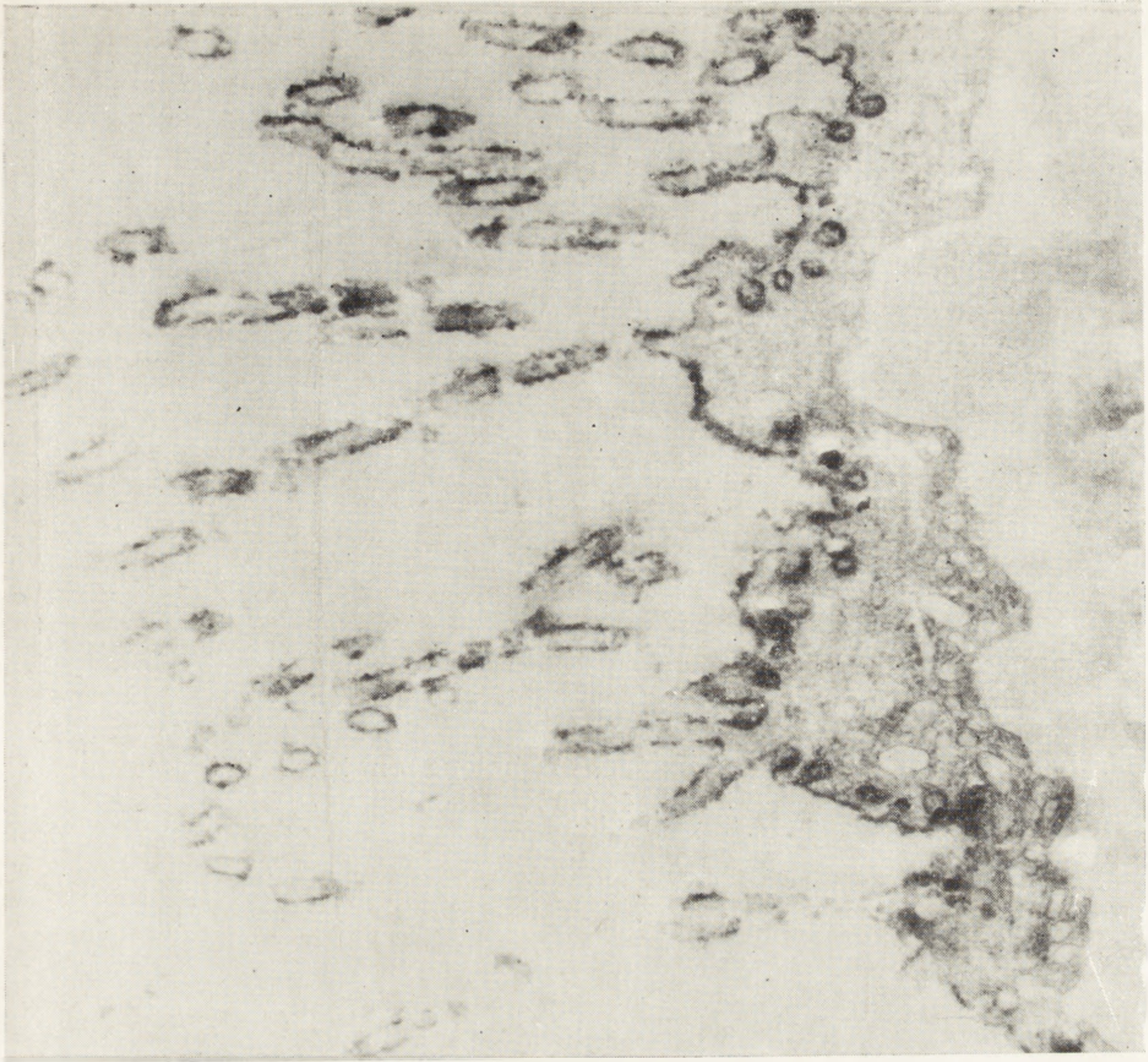


Fig. 3. Concanavalin A - peroxidase technique. Pleural mesothelial cell of mouse. 30,000 X

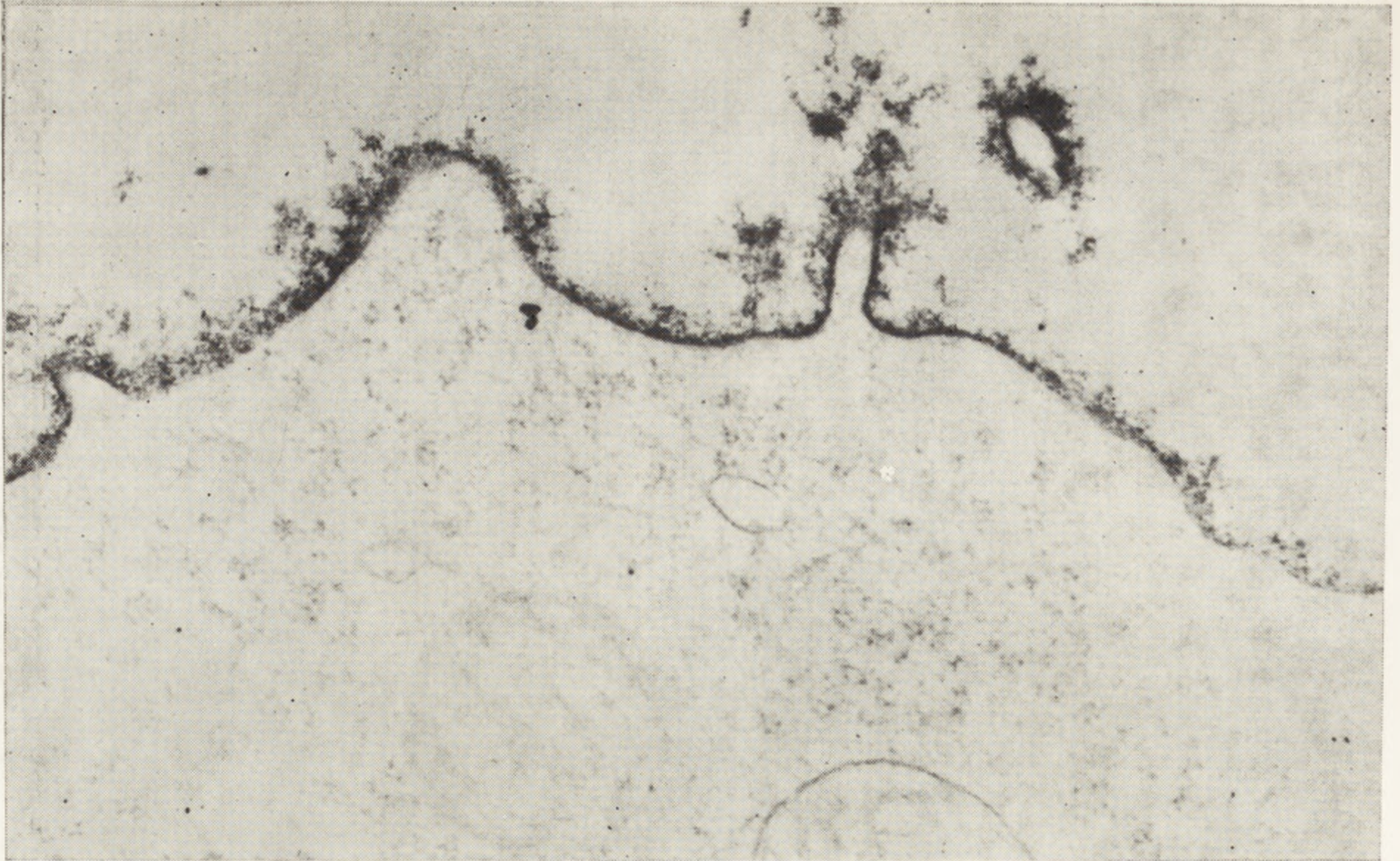


Fig. 4. *Lens culinaris*, lectin - peroxidase - technique on Ehrlich ascites tumor cell. 40,000  $\times$

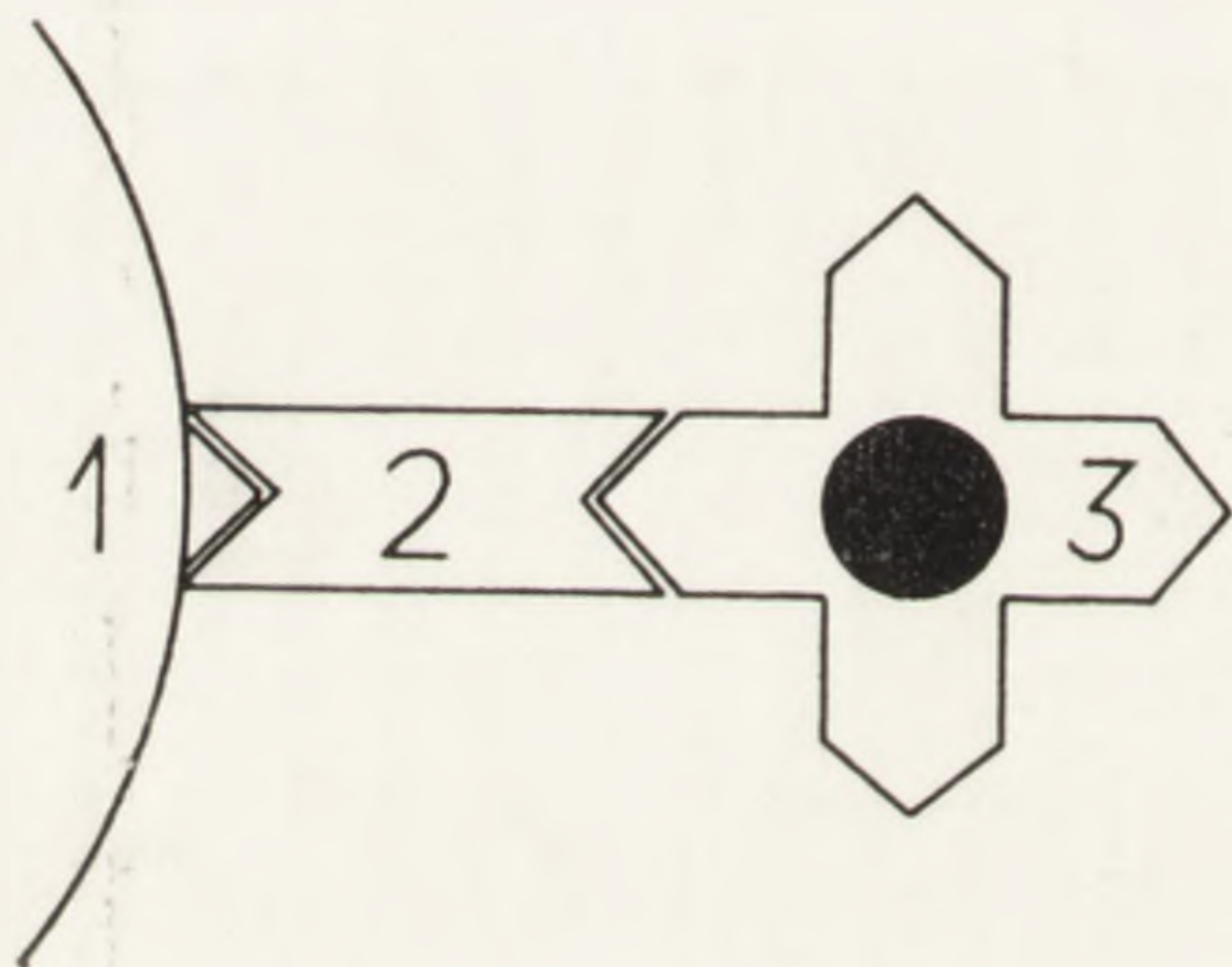


Fig. 5. Schematic representation of the Concanavalin A - mannan iron technique after Roth and Franz [163]. 1 — cell with lectin receptor, 2 — Concanavalin A (or *Lens culinaris* lectin), 3 — mannan iron complex.

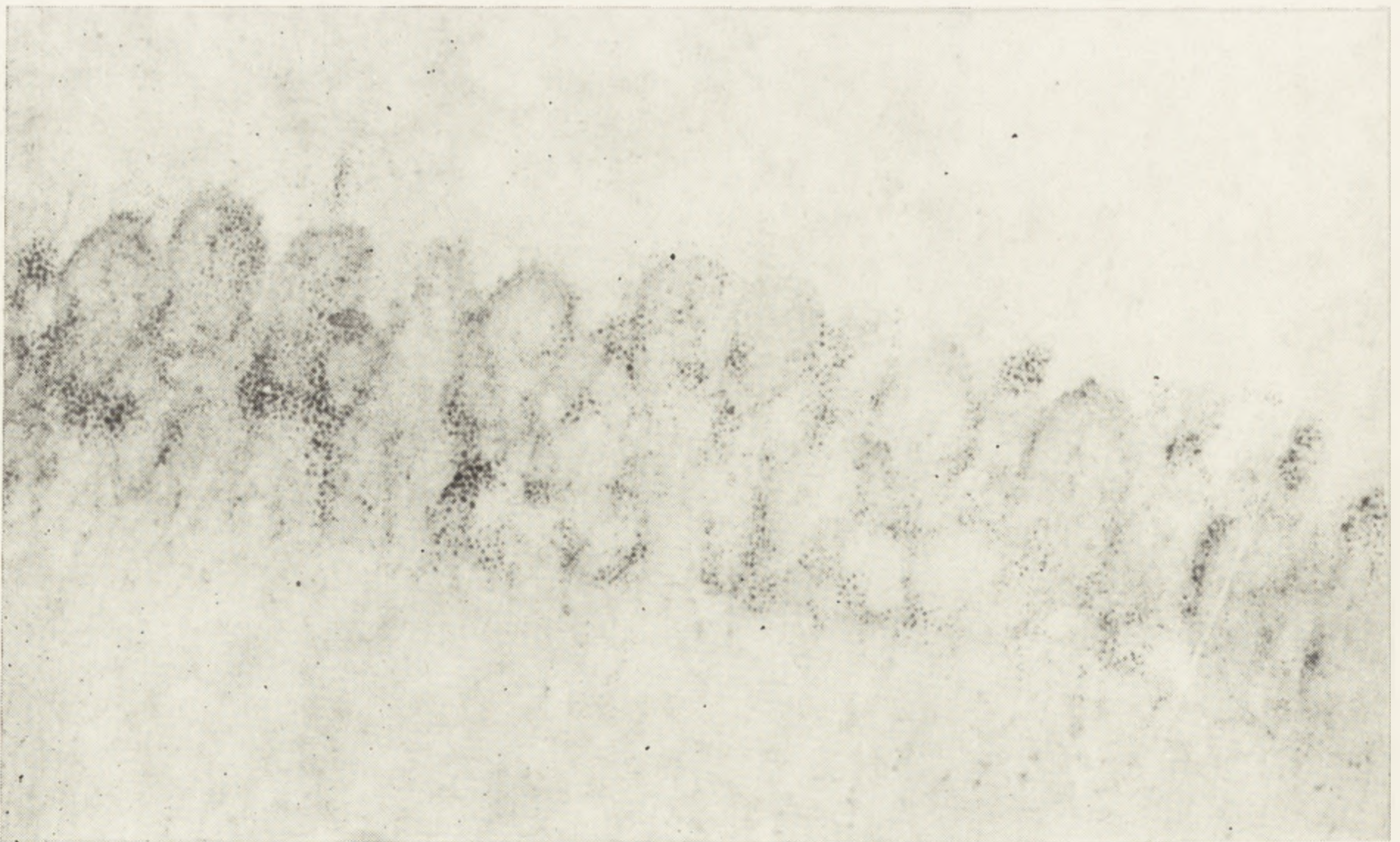


Fig. 6. Concanavalin A - mannan iron technique. Part of an intestinal mouse cell with brush border. 82,000  $\times$

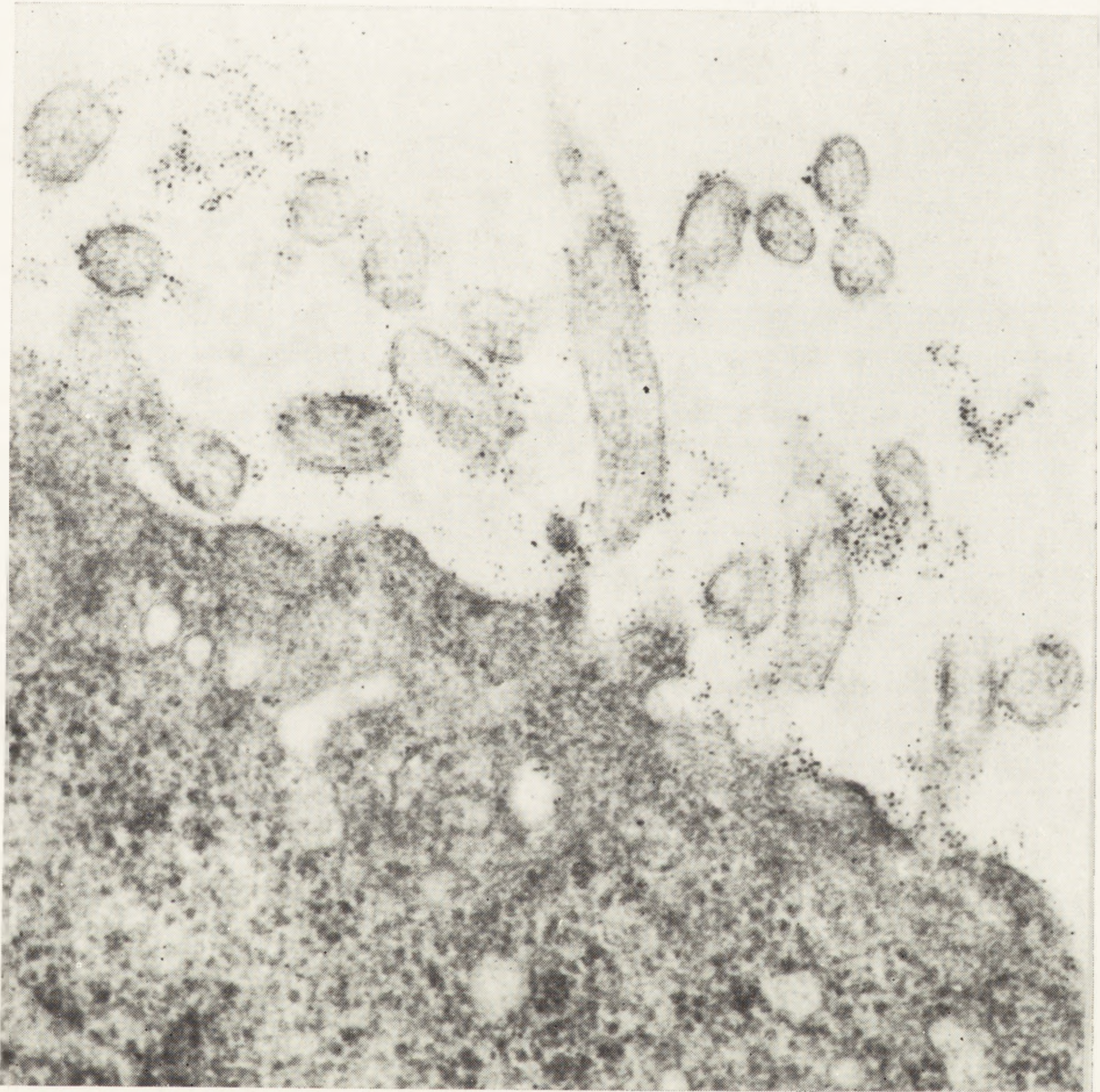


Fig. 7. Ferritin - labelled Concanavalin A. In vivo and in situ labelling of normal rat liver cell culture. 70,000  $\times$

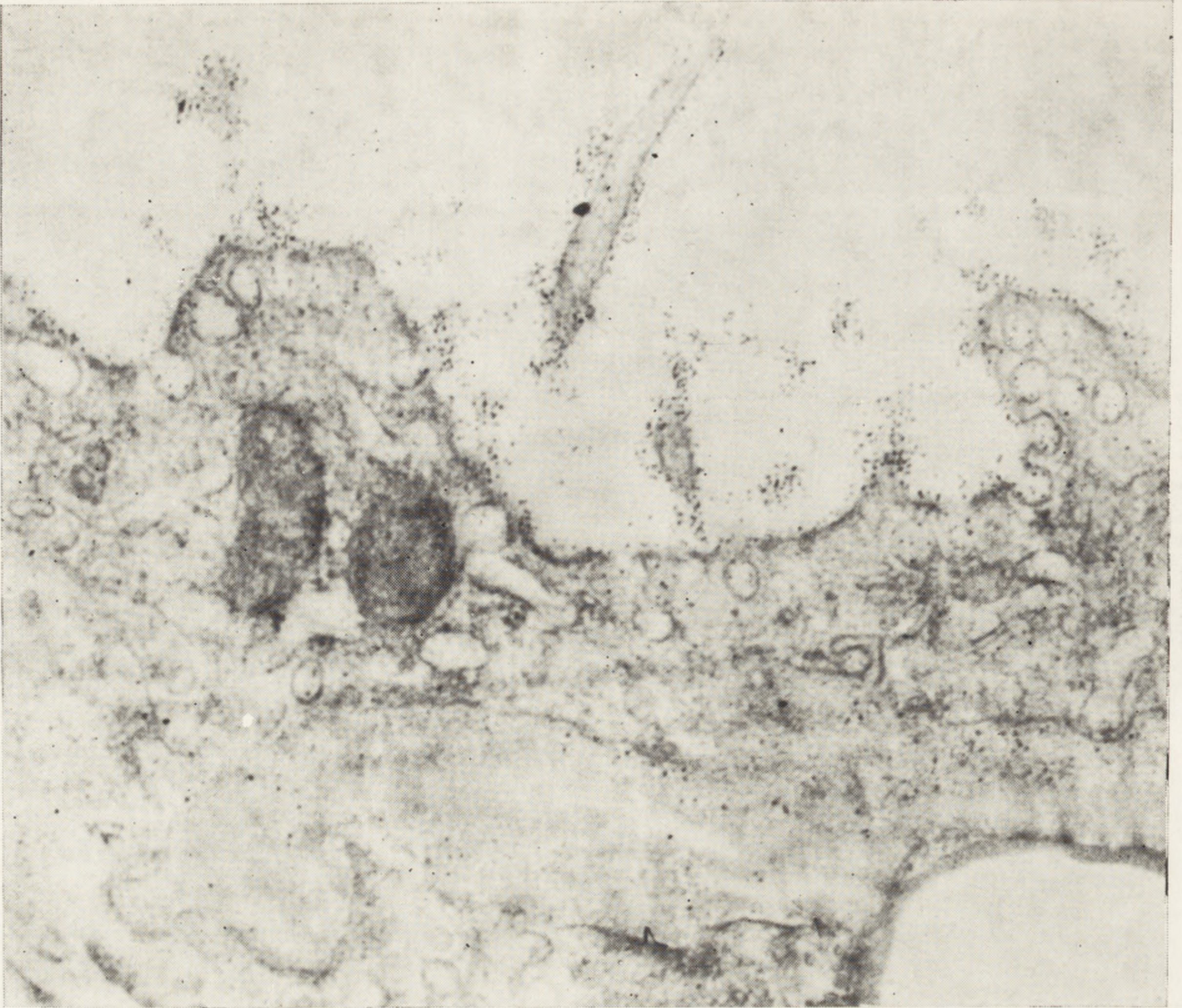


Fig. 8. Ferritin - labelled *Ricinus communis* agglutinin. Pleural mesothelial cell of mouse. 47,000  $\times$

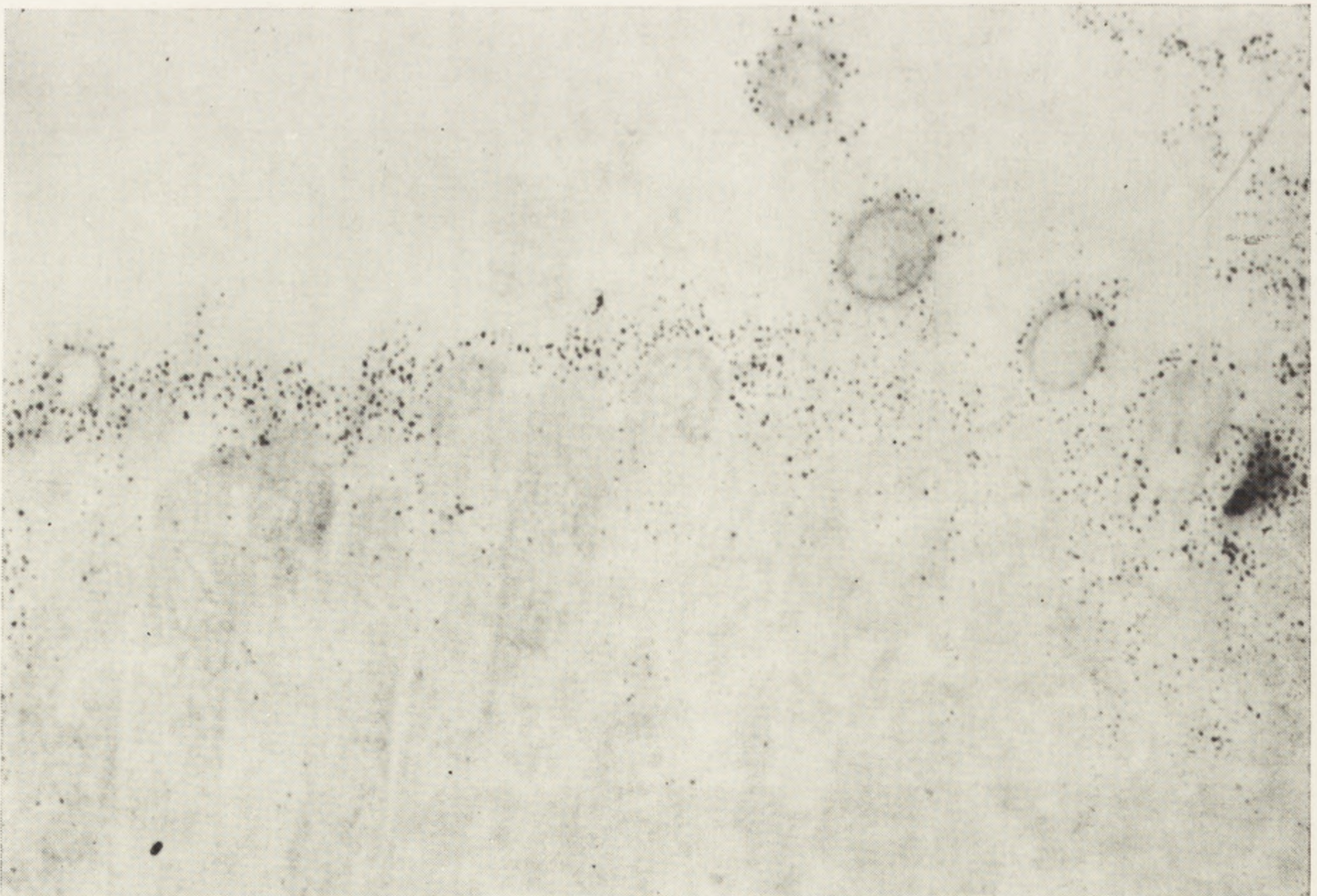


Fig. 9. Ferritin - labelled wheat germ agglutinin. Part of an intestinal rat cell with brush border. 80,000  $\times$

jugate purification consists in agarose gel filtration [193] or in density gradient centrifugation [165]. The size and electron density of the lectin - ferritin conjugates enabled a high resolution. The conjugates can be used in a one - step procedure for labelling of unfixed or prefixed cells under various conditions. An important application of lectin - ferritin conjugates consists in cell surface labelling for freeze - etch electron microscopy [144, 161, 165, 166, 167, 184]. After deep - etching of the fractured cells the lectin - ferritin conjugate at the cell surface can be localized to the intramembraneous particles of the membrane fracture face. In this way it is possible to correlate the number and distribution of lectin receptors to the intramembraneous particles.

#### LECTIN-ENZYME CONJUGATES

In contrast to sugar mediated binding of horseradish peroxidase to Concanavalin A, Huet and Garrido [76] and Gonatas and Avrameas [56] succeeded in covalently coupling peroxidase with various lectins using glutaraldehyde as a bifunctional agent. Stobo and Rosenthal [181] applied cytochrome oxidase for Concanavalin A labelling. The procedures for coupling the enzyme to lectin are similar to those for lectin - ferritin coupling. There exists the possibility for one - step or two - step glutaraldehyde coupling.

The latter includes activation of peroxidase by glutaraldehyde treatment resulting in introduction of aldehyde groups. In the second step the reaction between the aldehyde groups of the activated peroxidase and the carboxyl groups of lectins leads to a stable complex.

Beside these lectin techniques other seldom used methods exist. Horrisberger et al. [72] prepared a mercury - labelled Concanavalin A for demonstration of cell wall mannan in yeast cells. Wagner et al. [194] employed the colloidal gold technique for visualization of blood group A sites by protectin from *Helix pomatia* (Anti A<sub>Hel</sub>) on human erythrocytes. The gold - labelled Anti A<sub>Hel</sub> can be applied in freeze - etching for the study of the two dimensional arrangement of the cell surface receptors.

In comparison with other useful procedures for revealing polysaccharides [49, 116, 149, 202] the lectin techniques have some important advantages as recently summarized by Bernhard [19]: (a) they possess a high degree of specificity in the immunological sense for certain sugar residues; (b) the reactions may be carried out on living cells without denaturation of the receptors; (c) they can be applied for the study of the dynamic behaviour of the cell surface under various physiological conditions or after action of drugs and enzymes.

The application of lectin techniques to living cells is a fundamental advantage in comparison with other staining procedures for polysaccharides, since for the first time electron microscopic technique enabled studies of the mobility of cell surface carbohydrates. However, there exist same disadvantage consisting in the poor penetration of lectin into solid tissues as well as into the cells. In the case of organs such as the intestine [20, 163], the lung, the pleura, the tracheobronchial tree [159, 160, 165, 168] and the kidney [28] positive results could be obtained. The use of ultrathin frozen sections will solve these methodical difficulties.

#### LEKTYNY JAKO ODCZYNNIKI W MORFOLOGICZNYCH BADANIACH BUDOWY I DYNAMIKI POWIERZCHNI KOMÓREK

##### STRESZCZENIE

W ostatnich latach nagromadziły się dane wskazujące, że składniki cukrowe powierzchni komórki odgrywają rolę w regulacji podstawowych funkcji i właściwości komórki, takich jak wzrost, podział, wymiana informacji, różnicowanie i rozpoznawanie. Poza tym zmiany w strukturze cząsteczkowej i funkcjach powierzchni komórkowej zdają się wpływać na zmiany w sposobie rozrostu komórek po ich transformacji. Wprowadzono nowe sposoby oceny rodzaju i rozmieszczenia oraz dynamiki zachowania się węglowodanów powierzchni komórkowej na podstawie badań wzajemnego oddziaływania komórek zwierzęcych i lektyn. Lektyny są białkami, często glikoproteidami roślinnego pochodzenia, które specyficznie wiążą pewne reszty cukrowe na powierzchni komórek. W badaniach błon komórkowych, jak również dla wykazania węglowodanowych składników na powierzchni komórki metodą mikroskopii elektronicznej, ważne jest stosowanie lektyn dobrze oczyszczonych.

W artykule omówiono rys historyczny odkrycia lektyn, a następnie dokonano wyczerpującego przeglądu technik stosowanych do oczyszczenia tych substancji. Najlepiej rokującą metodą oczyszczania jest chromatografia powinowactwa z użyciem polimerów węglowodanowych jako adsorbentów. Metoda ta opiera się na właściwościach specyficznego wiązania się lektyn. Przykładowo opisano oczyszczenie metodą powinowactwa dwu lektyn specyficznych dla glukozy (z konkanawaliny A i *Lens culinaris*) na kolumnach dekstranowych. Grupa lektyn specyficznych dla galaktozy może być poddana oczyszczeniu podobną metodą na kolumnie z agarozy. Jako przykład opisano oczyszczenie lektyny z *Ricinus communis*. Do oczyszczania lektyn, dla których nie ma gotowych adsorbentów, można przygotować odpowiednie kolumny powinowactwa przez kowalencyjne związanie substancji specyficznych, jak np. monosacharydów, oligosacharydów albo glikoproteidów z odpowiednim nośnikiem. W następnym rozdziale podano budowę i biologiczne własności konkanawaliny A, aglutyniny z kiełków pszenicy, *Ricinus communis*, *Lens culinaris* (sozczewicy) i soji. Rozważono budowę cząsteczkową lektyn krystalicznych, specyficzność ich wobec cukrów oraz budowę miejsca wiązania lektyny z cukrem. Omówiono również wzajemne oddziaływanie z różnymi wielocukrami i komórkami. Krótka



wzmianka dotyczy budowy receptorów dla lektyn w błonie — receptory te składają się ze złożonych glikopeptydów. Lektyny są nową klasą odczynników służących do uwidoczniania w mikroskopie elektronowym pewnych reszt cukrowych na zasadzie ich zdolności wiązania cukrów oraz ich charakteru białkowego. Do tych celów lektyny wiąże się kowalencyjnie z elektronowo gęstymi znacznikami lub enzymami, używając zmodyfikowanej metody sprzęgania aldehydem glutarowym wg Avre-measa. Inne możliwości uwidocznienia lektyn wynikają z ich cytochemicznego powinowactwa, dzięki któremu nie zachodzi potrzeba kowalencyjnego wiązania pomiędzy lektyną a odpowiednim znacznikiem. W ostatnim rozdziale opisano technikę stosowaną dla lokalizacji miejsc wiązania lektyn oraz korzyści i wady tej metody.

## LITERATURE

- [1] ABE Y., IWABUCHI M., ISHII S. J., Multiple forms in the subunit structure of Concanavalin A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 1271-1278, 1971.
- [2] ADAIR W. L., KORNFELD S., Isolation of the receptors for wheat germ agglutinin and the *Ricinus communis* lectins from human erythrocytes using affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4696-4704, 1974.
- [3] AGRAWAL B. B. L., GOLDSTEIN I. J., Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels, *Biochem. J.*, **96**: 23 C-25 C, 1965.
- [4] AGRAWAL B. B. L., GOLDSTEIN S. J., Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of Concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels, *Biochim. Biophys. Acta*, **147**: 262-271, 1967.
- [5] AGRAWAL B. B., GOLDSTEIN I. J., Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in Concanavalin A-polysaccharide interaction, *Canad. J. Biochem.*, **46**: 1147, 1968.
- [6] AKEDO H., MORI Y., TANIGAKI Y., SHIKAI K., MORITA K., Isolation of Concanavalin A binding protein(s) from rat erythrocyte stroma, *Biochim. Biophys. Acta*, **271**: 378-387, 1972.
- [7] ALLAN D., AUGER J., CRUMPTON M. J., Glycoprotein receptor for Concanavalin A isolated from pig lymphocyte plasma membrane by affinity chromatography in sodium deoxycholate, *Nature New Biol.*, **236**: 23-25, 1972.
- [8] ALLEN A. K., NEUBERGER A., The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein, *Biochem. J.*, **135**: 307-314, 1973.
- [9] ALLEN A. K., NEUBERGER A., SHARON N.; The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin, *Biochem. J.*, **131**: 155-162, 1973.
- [10] ALTER G. M., MAGNUSON J. A., Characterization of Concanavalin A sugar binding site by <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance, *Biochemistry*, **13**: 4038-4045, 1974.
- [11] ANDERSSON J., SJÖBERG O., MÖLLER G., Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation, *Transplant. Rev.*, **11**: 131-177, 1972.
- [12] AUB J. C., TIESLAU C., LANKESTER A., Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **50**: 613-619, 1963.
- [13] AUB J. C., SANFORD B. H., COTE M. N., Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **54**: 396-399, 1965.

- [14] AUB J. C., SANFORD B. H., WANG L., Reactions of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **54**: 400-402, 1965.
- [15] AVRAMEAS S., Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies, *Immunochimistry*, **6**: 43-52, 1969.
- [16] — Emploi de la concanavaline - A pour l'isolement, la détection et la mesure des glycoprotéines et glucides extra ou endo-cellulaires, *C.R. Acad. Sci., (Paris)*, **270**: 2205-2208, 1970.
- [17] AVRAMEAS S., GUILBERT B., Biologically active waterinsoluble protein polymers. Their use for the isolation of specifically interacting proteins, *Biochimie*, **53**: 603-614, 1971.
- [18] BECKER J. W., REEKE jr. G. N., EDELMAN G. M., Location of the saccharide binding site of Concanavalin A, *J. Biol. Chem.*, **246**: 6123-6125, 1971.
- [19] BERNHARD W., The use of phytoagglutinins coupled with peroxidase for the localization of specific cell surface receptors [in] *Electron microscopy and Cytochemistry*, ed. Wisse, F., Daems, W. Th., Molnaar, J., van Duijn, P., North-Holland Publ. Company, Amsterdam, 283-298, 1973.
- [20] BERNHARD W., AVRAMEAS S., Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A, *Exptl. Cell Res.*, **64**: 232-236, 1971.
- [21] BERZINS K., BLOMBERG F., Identification of Concanavalin A-binding plasma membrane antigens of rat liver, *FEBS Letters*, **54**: 139-143, 1975.
- [22] BESANCON F., ANKEL H., Inhibition of interferon action by plant lectins, *Nature*, **250**: 784-786, 1974.
- [23] BESSLER W., GOLDSTEIN I. J., Phytohemagglutinin purification: a general method involving affinity and gel chromatography, *FEBS Letters*, **34**: 58-62, 1973.
- [24] BLOCH R., BURGER M. M., Purification of wheat germ agglutinin using affinity chromatography on chitin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**: 13-19, 1974.
- [25] BLUMBERG S., HILDESHEIM J., YARIV J., WILSON K. J., The use of 1-amino-L-fucose bound to Sepharose in the isolation of L-fucose binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **264**: 171-176, 1972.
- [26] BOYD W. C., *Fundamentals of immunology*, Interscience Publ., New York, 1947.
- [27] BOYD W. C., SLAPEIGH E., Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), *Science*, **119**: 419, 1954.
- [28] BRETTON R., BARIETY J., Ultrastructural localization of Concanavalin A in normal rat kidney-glomeruli and arterioles, *J. Ultrastruct. Res.*, **48**: 396-403, 1975.
- [29] BREWER C. F., MARCUS D. M., GROLLMAN A. P., Interactions of saccharides with Concanavalin A. Relation between calcium ions and the binding of saccharides to Concanavalin A, *J. Biol. Chem.*, **249**: 4614-4616, 1974.
- [30] BURGER M. M., A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **62**: 994-1001, 1969.
- [31] BURGER M. M., GOLDBERG A. R., Identification of a tumor specific determinant on neoplastic cell surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **57**: 359-366, 1967.

- [32] BURGER M. M., Surface changes in transformed cells detected by lectins, *Fed. Proc.*, **32**: 91-101, 1973.
- [33] CHASE P. S., MILLER F., Preliminary evidence for the structure of the Concanavalin - A binding site on human lymphocytes that induces mitogenesis, *Cell. Immunol.*, **6**: 132-139, 1973.
- [34] COLLARD J. G., TEMMINK J. H. M., Binding and cytochemical detection of cell - bound Concanavalin A, *Exp. Cell Res.*, **86**: 81-86, 1974.
- [35] CUATRECASAS P., Interaction of Concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver, *J. Biol. Chem.*, **248**: 3528-3534, 1973.
- [36] — Interaction of wheat germ agglutinin and Concanavalin A with isolated fat cells, *Biochemistry*, **12**: 1312-1323, 1973.
- [37] CUATRECASAS P., TELL G. P. E., Insulin - like activity of Concanavalin A and wheat germ agglutinin - Direct interactions with insulin receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**: 435-489, 1973.
- [38] CZECH M. P., LYNN W. S., Stimulation of glucose metabolism by lectins in isolated white fat cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **297**: 368-377, 1973.
- [39] DIEVARD J. C., BOURILLON R., Séparation et purification des sites récepteurs de la lectine de *Robinia* et de la concanavaline A, présents à la surface des cellules hépatiques normales et tumorales (hépatome de Zajdela), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**: 198-212, 1974.
- [40] DRYSDALE R. G., HERRICK P. R., FRANKS D., The specificity of the hemagglutinin of the castor bean, *Ricinus communis*, *Vox Sang.*, **15**: 194-202, 1968.
- [41] EDELMAN G. M., CUNNINGHAM B. A., RECKE jr. G. N., BECKER J. W., WAXDAL M. J., WANG J. L., The covalent and tridimensional structure of Concanavalin A, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 2580-2584, 1972.
- [42] ENTLICHER G., TICHA M., KOSTIR J. V., KOCOUREK J., Studies on phytohemagglutinins, II. Phytohemagglutinins of *Pisum sativum* L. and *Lens esculenta* Moench: specific interactions with carbohydrates, *Experientia*, **25**: 17-18, 1969.
- [43] ERSSON B., ASPERG K., PORATH J., The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotolaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **310**: 446-552, 1973.
- [44] ETZLER M. E., KABAT E. A., Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichus biflorus*, *Biochemistry*, **9**: 869-877, 1970.
- [45] FRANZ H., ROTH J., Preparation of carbohydrate - iron complexes as electron dense receptors for membrane bound lectins, *Histochemistry*, **41**: 361-363, 1975.
- [46] FRANZ H., ROTH J., ZISKA P., Chemische Grundlagen der Anwendung von Polysaccharid - Schwermetallkomplexen für den Lektinnachweis, 4. Arbeitstagung „Markierte Antikörper“, Berlin, 1975.
- [47] FLIEGEROVÁ O., SALVETOVÁ A., TICHÁ M., KOCOUREK J., Studies on phytohemagglutinins. XIX. Subunit structure of the lentil isophytohemagglutinins, *Biochim. Biophys. Acta*, **351**: 416-426, 1974.
- [48] GALBRAITH W., GOLDSTEIN J. J., Phytohemagglutinin of the lima bean (*Phaseolus lunatus*). Isolation, characterization, and interaction with type A blood - group substance, *Biochemistry*, **11**: 3976-3984, 1972.
- [49] GEYER G., Ultrahistochemie. Histochemische Arbeitsvorschriften für die

- Elektronenmikroskopie, VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1973, 2. Aufl.
- [50] GILBAO - GARBER, N., Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **273**: 165-173, 1972.
- [51] GOLDSTEIN I. J., HOLLERMAN C. E., MERRICK J. M., Protein - carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with Concanavalin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **97**: 68-76, 1965.
- [52] GOLDSTEIN I. J., HOLLERMAN C. E., SMITH E. E., Protein - carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides, *Biochemistry*, **4**: 876-885, 1965.
- [53] GOLDSTEIN I. J., SO L. L., YANG Y., CALLIES Q. C., Protein - carbohydrate interaction. XIX. The interaction of Concanavalin A with IgM and the glycoprotein phytohemagglutinins of the wax bean and the soy bean, *J. Immunol.*, **103**: 695-698, 1969.
- [54] GOLDSTEIN I. J., REICHERT C. M., MISAKI A., GORIN P. A. J., An "extension" of the carbohydrate binding specificity of Concanavalin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **317**: 500-504, 1973.
- [55] GOLDSTEIN I. J., REICHERT C. M., MISAKI A., Interaction of Concanavalin A with model substrates, *Ann. NY Acad. Sci.*, **234**: 283-286, 1974.
- [56] GONATAS N. K., AVRAMEAS S., Detection of plasma membrane carbohydrates with lectin peroxidase conjugates, *J. Cell Biol.*, **59**: 436-443, 1973.
- [57] GORDON J. A., BLUMBERG S., LIS H., SHARON N., Purification of foyban agglutinin by affinity chromatography on Sepharose - N -  $\epsilon$  - aminocaproyl -  $\beta$  - D - galactopyromozylamine, *FEBS Letters*, **24**: 193-196, 1972.
- [58] GORDON J. A., MARQUARDT M. D., Factors affecting hemagglutination by Concanavalin A and soy bean agglutinin, *Biochim. Biophys. Acta*, **332**: 136-144, 1974.
- [59] GRAHAM R. C., KARNOVSKY M. J., The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 291-302, 1966.
- [60] GREENAWAY P. J., LE VINE D., Binding of N - acetyl - neuraminic acid by wheat - germ agglutinin, *Nature New Biol.*, **241**: 191-192, 1973.
- [61] GREENBERG J. H., JAMIESON G. A., The effects of various lectins on platelet aggregation and release, *Biochim. Biophys. Acta*, **345**: 231-242, 1974.
- [62] GRIMALDI J., SYKES B. D., Concanavalin A: A stopped flow nuclear magnetic resonance study of conformational changes induced by  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ , and  $\alpha$  - methyl - D - mannoside, *J. Biol. Chem.*, **250**: 1618-1624, 1975.
- [63] GÜRTLER L. G., HORSTMANN H. J., Subunits of toxin and agglutinin of *Ricinus communis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **295**: 582-584, 1974.
- [64] HAMMARSTRÖM S., KABAT E. A., Purification and characterization of a blood group A reactive hemagglutinin from the snail (*Helix pomatia*) and a study of its combining site, *Biochemistry*, **8**: 2696-2705, 1969.
- [65] HARDMAN K. D., WOOD M. K., SCHIFFER M., EDMUNDSON A. B., AINSWORTH C. F., X - ray crystallographic studies of Concanavalin A, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**: 271-276, 1971.
- [66] HARDMAN K. D., AINSWORTH C. F., Structure of Concanavalin A at 2.4 - Å resolution, *Biochemistry*, **11**: 4910-4919, 1972.

- [67] — Myc-inositol binding site of Concanavalin A, *Nature New Biol.*, **237**: 54-55, 1972.
- [68] — Binding of nonpolar molecules by crystalline Concanavalin A, *Biochemistry*, **12**: 4442-4448, 1973.
- [69] HAYES C. E., GOLDSTEIN I. J., An  $\alpha$ -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1904-1914, 1974.
- [70] HIRANO H., PARKHOUSE B., NICOLSON G. L., LENNOX E. S., SINGER J. S., Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma cell homogenate: its implications for membrane biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**: 2945-2949, 1972.
- [71] HOOK W. A., BROWN H., OPPENHEIM J. J., Histamine release from human leucocytes by Concanavalin A and other mitogens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**: 659-663, 1974.
- [72] HORISBERGER M., BAUER H. BUSH D. A., Mercury labelled Concanavalin A as a marker in electron microscopy - localization of mannan in yeast cell walls, *FEBS Letters*, **18**: 311-314, 1971.
- [73] HOWARD I. K., SAGE H. J., Isolation and characterization of a phytohemagglutinin from the lentil, *Biochemistry*, **8**: 2436-2441, 1969.
- [74] HOWARD I. K., SAGE H. J., STEIN M. D., YOUNG N. M., LEON M. A., DYCKES D. F., Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. II. Multiple forms of *Lens culinaris* hemagglutinin, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1590-1595, 1971.
- [75] HUDGIN R. L., PRICER W. E., ASHWELL G., STOCKERT R. J., MORELL A. G., The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **249**: 5536-5543, 1974.
- [76] HUET C., GARRIDO J., Ultrastructural visualization of cell coat components by means of wheat germ agglutinin, *Exp. Cell Res.*, **75**: 523-527, 1972.
- [77] HUET Ch., LONCHAMPT M., HUET M., BERNADAC A., Temperature effects on the Concanavalin A molecule and on Concanavalin A binding, *Biochim. Biophys. Acta*, **365**: 28-39, 1974.
- [78] HUET C., BERNADAC A., Peroxidase binding to cell-bound Concanavalin A, *Exp. Cell Res.*, **89**: 429-431, 1974.
- [79] HUNT R. C., BULLIS C. M., BROWN J. C., Isolation of a Concanavalin A receptor from mouse L cells, *Biochemistry*, **14**: 109-115, 1975.
- [80] IRIMURA T., OSAWA T., Studies on a hemagglutinin from *Bauhinia purpurea* alba seeds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**: 475-482, 1972.
- [81] IRIMURA T., KAWAGUCHI T., TERAS T., OSAWA T., Carbohydrate-binding specificity of the so-called galactose-specific phytohemagglutinins, *Carbohydrate Res.*, **39**: 317-327, 1975.
- [82] ISHIGURO M., TAKAHASHI T., FUNATSU G., HAYASHI K., FUNATSU M., Purification of Ricin, *J. Biochem.*, **55**: 587-592, 1964.
- [83] ITO M., BARON L. M., Inactivation of herpes simplex virus by Concanavalin A, *J. Virology*, **13**: 1312-1318, 1975.
- [84] IGER R. N., GOLDSTEIN I. J., Quantitative studies on the interaction of Concanavalin A, the carbohydrate-binding protein of the jack bean, with model carbohydrate-protein conjugates, *Immunochemistry*, **10**: 313-322, 1973.
- [85] KABAT E. A., HEIDELBERGER M., BEZER S., A study of the purification and properties of ricin, *J. Biol. Chem.*, **168**: 629-639, 1947.

- [86] KALB A. J., LEVITZKI A., Metal-binding sites of Concanavalin A and their role in the binding of  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside, *Biochem. J.*, **109**: 669-672, 1968.
- [87] KALB A. J., LUSTIG A., The molecular weight of Concanavalin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **168**: 366-367, 1968.
- [88] KAN T. J., DOYLE R. J., BIRDSELL D. C., Mechanism of the formation of Concanavalin A-teichoic acid complexes, *Carbohydrate Res.*, **31**: 401-404, 1973.
- [89] KARNOVSKY M. J., UNANUE E. R., LEVENTHAL M., Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. II. Mapping of surface moieties, *J. Exp. Med.*, **136**: 907-930, 1972.
- [90] KAWAGUCHI T., MATSUMOTO J., OSAWA T., Studies on hemagglutinins from *Maackia amurensis* seeds, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2786-2792, 1974.
- [91] KAY C. M., The presence of  $\beta$ -structure in Concanavalin A, *FEBS Letters*, **9**: 78, 1970.
- [92] KISHIYE T., TOYOSHIMA S., OSAWA T., Effect of *Ricinus communis* lectins on the membrane fluidity of human peripheral lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**: 681-686, 1974.
- [93] LANDSTEINER K., RAUBITSCHKE H., Beobachtungen zur Hämolyse und Hämagglutination, *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, **45**: 660-667, 1908.
- [94] LEON M. A., SCHWARTZ H. J., Inhibition of delayed hypersensitivity to tuberculin by Concanavalin A, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **131**: 735-736, 1969.
- [95] LESENY A. M., BOURILLON R., KORNFELD S., The nature of the erythrocyte receptor site for *Robinia pseudoacacia* phytohemagglutinin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**: 831-836, 1972.
- [96] LE VINE D., KAPLAN M. J., GREENAWAY P. J., The purification and characterization of wheat-germ agglutinin, *Biochem. J.*, **129**: 847-856, 1972.
- [97] LIENER I. E., PALLANSCH M. J., Purification of a toxic substance from defatted soy bean flour, *J. Biol. Chem.*, **197**: 29-36, 1952.
- [98] LIN J. Y., LIU K., CHEN C. C., TENG T. C., Effect of crystalline Ricin on the biosynthesis of protein, RNA and DNA in experimental tumor cells, *Cancer Res.*, **31**: 921-924, 1971.
- [99] LIN J. Y., PAO C. C., JU S. T., TENG T. C., Polyribosome disaggregation in rat liver following administration of the phytotoxic proteins, Abrin and Ricin, *Cancer Res.*, **32**: 943-947, 1972.
- [100] LIS H., FRIDMAN C., SHARON N., KATCHALSKI E., Multiple hemagglutinins in soy bean, *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**: 201-309, 1966.
- [101] LIS H., SELA B., SACHS L., SHARON N., Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces, *Biochim. Biophys. Acta*, **211**: 582-585, 1970.
- [102] LIS H., SHARON N., The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**: 541-574, 1973.
- [103] LIS H., LOTAN R., SHARON N., Synthesis and use of affinity chromatography columns for the purification of plant lectins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **234**: 232-238, 1974.
- [104] LLOYD K. O., KABAT E. A., BEYCHOK S., Immunochemical studies on blood groups. XLIII. The interaction of blood group substances from various sources with a plant lectin, Concanavalin A, *J. Immunol.*, **102**: 1354, 1969.
- [105] LOONTIENS F. G., van WAUWE J. P., DE GUSSEM R., DE BRUYNE C. K.,

- Binding of para - substituted phenylglycosides to Concanavalin A, *Carbohydrate Res.*, **30**: 51-62, 1973.
- [106] LOTAN R., GUSSIN A. E. S., LIS H., SHARON N., Purification of wheat germ agglutinin by affinity chromatography on a Sepharose - bound N - acetyl - glucosamine derivative, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 656-662, 1973.
- [107] LOTAN R., SHARON N., The fluorescence of wheat - germ agglutinin and of its complexes with saccharides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**: 1340-1346, 1973.
- [108] LOTAN R., LIS H., ROSENWASSER A., NOVOGRODSKY A., SHARON N., Enhancement of the biological activities of soybean agglutinin by cross - linking with glutaraldehyde, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**: 1347-1355, 1973.
- [109] LOTAN R., GUSSIN A. E. S., LIS H., SHARON N., Purification of wheat germ agglutinin by affinity chromatography on a Sepharose - bound N - acetyl - glucosamine derivative, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**: 656-662, 1973.
- [110] LOTAN R., SIEGELMAN H. W., LIS H., SHARON N., Subunit structure of soybean agglutinin, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1219-1224, 1974.
- [111] LOTAN R., LIS H., SHARON N., Aggregation and fragmentation of soybean agglutinin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**: 144-150, 1975.
- [112] LOTAN R., DEBRAY H., CACAN M., CACAN R., SHARON N., Labeling of soybean agglutinin by oxidation with sodium periodate followed by reduction with sodium <sup>3</sup>H borohydride, *J. Biol. Chem.*, **250**: 1955-1957, 1975.
- [113] LOTAN R., SHARON N., MIRELMAN D., Interaction of wheat - germ agglutinin with bacterial cells and cell - wall polymers, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 257-262, 1975.
- [114] MARKOWITZ H., PERSON D. A., GITNICK G. L., RITTS R. A., Immunosuppressive activity of Concanavalin A, *Science*, **163**: 476, 1969.
- [115] MARTIN B. J., SPICER S. S., Concanavalin A - iron dextran technique for staining cell surface mucosubstances, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 206-207, 1974.
- [116] MARTINEZ - PALOMO A., The surface coats of animal cells, *Int. Rev. Cytol.*, **29**: 29-75, 1970.
- [117] MATSUMOTO J., OSAWA T., The specific purification of various carbohydrate - binding hemagglutinins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 1810-1815, 1975.
- [118] McKENZIE G. H., SAWYER W. H., The binding properties of dimeric and tetrameric Concanavalin A. Binding of ligands to noninteracting macromolecular acceptors, *J. Biol. Chem.*, **248**: 549-556, 1973.
- [119] McKENZIE G. H., SAWYER W. H., NICHOL L. W., The molecular weight and stability of Concanavalin A, *Biochim. Biophys. Acta*, **263**: 283-293, 1974.
- [120] MÖLLER G., Immunocyte triggering, *Cell. Immunol.*, **1**: 573-582, 1970.
- [121] NAGATA Y., BURGER M. M., Wheat germ agglutinin. Isolation and characterization, *J. Biol. Chem.*, **247**: 2248-2250, 1972.
- [122] — Wheat germ agglutinin Molecular characteristics and specificity for sugar binding, *J. Biol. Chem.*, **249**: 3116-3122, 1974.
- [123] NERI G., SMITH D. F., GILLIAM E. B., WALBORG jr. E. F., Concanavalin A and wheat germ agglutinin receptor activity of sialoglycopeptides isolated

- from the surface of Novikoff hepatoma cells, Arch. Biochem. Biophys., **165**: 323-330, 1974.
- [124] NICOLSON G. L., SINGER S. J., Ferritin - conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: application to saccharides bound to cell membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**: 942-945, 1971.
- [125] NICOLSON G. L., BLAUSTEIN J., The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surfaces, Biochim. Biophys. Acta, **266**: 543-547, 1972.
- [126] NICOLSON G. L., The interactions of lectins with animal cell surfaces, Int. Rev. Cytol., **39**: 89-190, 1974.
- [127] NICOLSON G. L., BLAUSTEIN J., ETZLER M. E., Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma, Biochemistry, **13**: 196-204, 1974.
- [128] NICOLSON G. L., Ultrastructural analysis of toxin binding and entry in mammalian cells, Nature, **251**: 628-630, 1974.
- [129] NICOLSON G. L., SINGER S. J., The distribution and asymmetry of saccharides on mammalian cell membrane surfaces utilizing ferritin - conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains, J. Cell Biol., **60**: 236-248, 1974.
- [130] NICOLSON G. L., LACORBIERE M., HUNTER T. R., Mechanism of cell entry and toxicity of an affinity - purified lectin from *Ricinus communis* and its differential effects on normal and virus - transformed fibroblasts, Cancer Res., **35**: 144-155, 1975.
- [131] NICOLSON G. L., Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. Cytoplasmic influence over cell surface components, Biochim. Biophys. Acta, **457**: 57-108, 1976.
- [132] NIRMUL G. SEVERIN C., TAUB R. N., In vivo effects of Concanavalin A. I. Immunosuppressive effects, Transplantation, **14**: 91-95, 1972.
- [133] OKADA Y., KIM J., Interaction of Concanavalin A with enveloped viruses and host cells, Virology, **50**: 507-515, 1972.
- [134] OLSNES S., PIHL A., Ricin - a potent inhibitor of protein synthesis, FEBS Letters, **20**: 327-329, 1972.
- [135] — Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent - peptide chains, Eur. J. Biochem., **35**: 179-185, 1973.
- [136] — Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis, Biochemistry, **12**: 3121-3126, 1973.
- [137] OLSNES S., SALTVEDT E., PIHL A., Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*, J. Biol. Chem., **249**: 803-810, 1974.
- [138] OLSON M. O. J., LIENER J. E., Some physical and chemical properties of Concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean, Biochemistry, **6**: 106-111, 1967.
- [139] OPPENHEIM J. D., NACHBAR M. S., SALTON M. R. J., AULL F., Purification of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus* by affinity chromatography, Biochem. Biophys. Res. Commun., **58**: 1127-1134, 1974.
- [140] PARDOE G. J., BIRD G. W. G., UHLENBRUCK G., The nature of the specific receptors for *Ricinus communis* and *Solanum tuberosum* lectins, Z. Immunitätsforsch., **137**: 445-457, 1968.



- [141] PAULOVA M., TICHÁ M., ENTLICHER G., KOSTIŘR J. V., KOCOUREK J., Studies on phytohemagglutinins. IX. Metal content and activity of the hemagglutinin from the lentil (*Lens esculenta* Moench), *Biochim. Biophys. Acta*, **252**: 388-395, 1971.
- [142] PENHOET E., OLSNES C., CARLSON S., LACORBIERE M., NICOLSON G. L., Quantitative interaction of *Ricinus communis* agglutinin and Concanavalin A with Influenza and vesicular stomatitis viruses and virus-infected normal and polyoma-transformed cells, *Biochemistry*, **13**: 3561-3566, 1974.
- [143] PEREIRA M. E. A., KABAT E. A., SHARON N., Immunochemical studies on the specificity of soybean agglutinin, *Carbohydrate Res.*, **37**: 89-102, 1974.
- [144] PINTO da SILVA P., NICOLSON G. L., Freeze-etch localization of Concanavalin A receptors to the membrane intercalated particles on human erythrocyte membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **363**: 311-319, 1974.
- [145] PORETZ R. D., RISS H., TIMBERLAKE J. W., CHIEN S. U., Purification and properties of the hemagglutinin from *Sophora japonica* seeds, *Biochemistry*, **13**: 250-256, 1974.
- [145a] PRESANT C. A., KORNFELD S., Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin, *J. Biol. Chem.*, **247**: 6937-6945, 1972.
- [146] PRIVAT J.-P., DELMOTTE F., MONSIGNY M., Protein-sugar interactions. Association of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linked N-acetyl-D-glucosamine oligomer derivatives with wheat-germ agglutinin (lectin), *FEBS Letters*, **46**: 224-228, 1974.
- [147] — Protein-sugar interactions. Association of wheat germ agglutinin (lectin) and O-(4-methyl-umbelliferyl)-glycosides, *FEBS Letters*, **46**: 229-232, 1974.
- [148] PRIVAT J.-P., DELMOTTE F., MIALONIER G., BOUCHARD P., MONSIGNY M., Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (lectin), *Eur. J. Biochem.*, **47**: 5-14, 1974.
- [149] RAMBOURG A., Morphological and histochemical aspects of glycoproteins at the surface of animal cells, *Int. Rev. Cytol.*, **31**: 57-114, 1974.
- [150] RAPIN A. M. C., BURGER M. M., Tumor cell surfaces: General alterations detected by agglutinins, *Adv. Cancer Res.*, **20**: 1-91, 1974.
- [150a] REECKE G. N., Relationship between the structure and activities of Concanavalin A, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **234**: 369, 1974.
- [151] REITHERMANN R. W., ROSEN S. D., BARONDES S. H., Lectin purification using formalinized erythrocytes as a general affinity adsorbant, *Nature*, **248**: 599-600, 1974.
- [152] RENKONEN K. O., Studies on hemagglutinins present in seeds of some representative leguminosae, *Ann. Med. Exp. Fenn.*, (Helsinki), **26**: 66-71, 1948.
- [153] RIORDAN J. R., SLAVIK M., Interactions of lectins with membrane glycoproteins. Effects of Concanavalin A on 5'-nucleotidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **373**: 356-360, 1974.
- [154] ROBBINS J. C., NICOLSON G. L., Surfaces of normal and transformed cells (in) *Cancer: A comprehensive treatise* ed. F. F. Becker, Plenum Press, New York, in press.
- [155] ROCHE A.-C., MONSIGNY M., Purification and properties of Limulin: a lectin (agglutinin) from hemolymph of *Limulus polyphemus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **371**: 242-254, 1974.
- [156] ROCHE A.-C., SCHAUER R., MONSIGNY M., Protein sugar interactions.

- Purification by affinity chromatography of Limulin, an N - acyl - neuramini-  
dyl - binding protein, FEBS Letters, 57: 245-249, 1975.
- [157] ROSEN S. D., KAFKA J. A., SIMPSON D. L., BARONDES S. H., Develop-  
mentally regulated, carbohydrate binding protein in *Dictyostelium disco-*  
*ideum*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 70: 2554-2557, 1973.
- [158] ROSEN S. D., SIMPSON D. L., ROSE J. E., BARONDES S. H., Carbohydrate -  
binding protein from *Polysphondylium pallidum* implicated in intercellular  
adhesion, Nature, 252: 128; 149-151, 1974.
- [159] ROTH J., Ultrahistochemical demonstration of saccharide components of  
complex carbohydrates at the alveolar cell surface and at the mesothelial  
cell surface of the pleura visceralis of mice by means of Concanavalin A,  
Exp. Pathol., 8: 157-167, 1973.
- [160] — Electron microscopic demonstration of saccharide moieties in the hypo-  
phase of the alveolar surfactant system, Respir. Physiol., 23: 325-335, 1975.
- [161] ROTH J., WAGNER M., MEYER H. W., Topography of Concanavalin A  
receptors on Ehrlich ascites tumor cells as demonstrated by thin sections  
and freeze - etching, Path. Europ., 9: 31-42, 1974.
- [162] ROTH J., THOSS K., Light and electron microscopic demonstration of  
D - mannose and D - glucose like sites at the cell surface by means of the  
lectin from the *Lens culinaris*, Experientia, 30: 414, 1974.
- [163] ROTH J., FRÄNZ H., Ultrastructural detection of lectin receptors by cyto-  
chemical affinity reaction using mannan-iron complex, Histochemistry, 41:  
365-368, 1975.
- [164] ROTH J., FRANZ H., THOSS K., Anwendung von Polysaccharid - Schwer-  
metallkomplexen zum Nachweis von Lektinen bzw. von Lektinrezeptoren.  
4. Arbeitstagung "Markierte Antikörper", Berlin, 1975.
- [165] ROTH J., THOSS K., WAGNER M., MEYER H. W., Electron microscopic  
demonstration of cell surface carbohydrates by means of peroxidase and  
ferritin complexes of the *Lens culinaris* lectin, Histochemistry, 43: 275-282,  
1975.
- [166] ROTH J., WAGNER M., MEYER H. W., Untersuchungen über die Concana-  
valin A - Rezeptoren von Kaninchenerythrozyten und von Erythrozytenschat-  
ten mit der Immun - Elektronenmikroskopie, Blut, 30: 31-38, 1975.
- [167] — Nachweis von Makromolekülen der Zelloberfläche mit Hilfe der Immun -  
Gefrierätzung, Acta Histochem. Suppl., Bd. XV: 315-318, 1975.
- [168] ROTH J., WAGNER M., THOSS K., Wheat germ agglutinin and *Ricinus*  
*communis* agglutinin as specific saccharide stains in light and electron  
microscopy, Exp. Pathol., 11: 67-72, 1975.
- [169] SAWYER W. H., MCKENZIE G. H., NICHOL L. W., A conformational transi-  
tion in Concanavalin A. Conformational differences between intact and frag-  
mented units, Aust. J. Biol. Sci., 27: 1-6, 1974.
- [170] SCHMIDT - ULLRICH R., WALLACH D. F. H., HENDRICKS J., Concana-  
valin A - reactive protein of rabbit thymocyte plasma membranes: analysis  
by crossed immune electrophoresis and sodium dodecylsulfate/polyacrylamide  
gel electrophoresis, Biochim. Biophys. Acta, 382: 295-310, 1975.
- [171] SHARON N., LIS H., Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins,  
Science, 177: 949-959, 1972.
- [172] SHERRY A. D., NEWMAN A. D., GUTZ C. G., The activation of Concana-  
valin A by lanthanide ions, Biochemistry, 14: 2191-2196, 1975.

- [173] SMITH S. B., REVEL J. P., Mapping of Concanavalin A binding sites on the surface of several cell types, *Develop. Biol.*, **27**: 434-441, 1972.
- [174] SO L. L., GOLDSTEIN I. J., Protein - carbohydrate interaction. IX. Application of the quantitative hapten inhibition technique to polysaccharide Concanavalin A interaction. Some comments on the forces involved in Concanavalin A - polysaccharid interaction, *J. Immunol.*, **99**: 158-163, 1967.
- [175] — Protein - carbohydrate interaction. IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide - Concanavalin A interaction, *J. Biol. Chem.*, **242**: 1617-1622, 1967.
- [176] — Protein - carbohydrate interaction. XIII. The interaction of Concanavalin A with  $\alpha$ -mannans from a variety of microorganism, *J. Biol. Chem.*, **243**: 2003 - 2007, 1968.
- [177] STEFANOVIC V., MANDEL P., ROSENBERG A., Concanavalin A inhibition of ecto - 5' - nucleotidase of intact cultured C 6 glioma cells, *J. Biol. Chem.*, **250**: 7081-7083, 1975.
- [178] STEIN M. D., HOWARD I. K., SAGE H. J., Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. IV. Direct binding studies of *Lens culinaris* hemagglutinin with simple sugars, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**: 353-355, 1971.
- [179] STILLMARK H., Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen, Inaug. Diss. Dorpat, 1888.
- [180] — Über Ricin. Arb. Pharmakol. Inst. zu Dorpat, **3**: 59-151, 1889.
- [181] STOBO J. D., ROSENTHAL A. S., Biologically active Concanavalin A complexes suitable for light and electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **70**: 443-447, 1972.
- [182] SUMNER J. B., HOWELL S. F., The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A, *J. Bacteriol.*, **32**: 227-237, 1936.
- [182a] SUNDBERG L., PORATH J., ASPERG K., Simultaneous isolation of trypsin inhibitor and anti - A phytohemagglutinin from *Vicia cracca* by means of biospecific adsorption, *Biochim. Biophys. Acta*, **221**: 394-395, 1970.
- [183] TICHÁ M., ENTLICHER G., KOSTIR J. V., KOCOUREK J., Studies on phytohemagglutinins. IV. Isolation and characterization of a hemagglutinin from the lentil *Lens esculenta*, Moench. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**: 282-289, 1970.
- [184] TILLACK T. W., SCOTT R. E., MARCHESI V. T., The structure of erythrocyte membranes studied by freeze - etching. II. Localization of receptors for phytohemagglutinin and Influenza virus to the intramembraneous particles, *J. Exp. Med.*, **135**: 1209-1227, 1972.
- [185] TEMMINK J. H. M., COLLARD J. G., SPITS H., ROOS E., A comparative study of four cytochemical detection methods of Concanavalin A binding sites on the cell membrane, *Exp. Cell Res.*, **92**: 307-322, 1975.
- [186] TOMITA M., KUROKAWA T., ONOZAKI K., ICHIKI N., OSAWA T., UKITA T., Purification of galactose - binding phytoagglutinins and phytotoxin by affinity column chromatography using Sepharose, *Experientia*, **28**: 84-85, 1972.
- [187] TOYOSHIMA S., FUKUDA M., OSAWA T., Chemical nature of the receptor site for various phytomitogens, *Biochemistry*, **11**: 4000-4005, 1972.
- [188] TOYOSHIMA S., OSAWA T., Lectins from *Wistaria floribunda* seeds and their effect on membrane fluidity of human peripheral lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **250**: 1655-1660, 1975.

- [189] TRICHE T. J., TILLACK T. W., KORNFELD S., Localization of the binding sites for the *Ricinus communis*, *Agaricus bisporus* and wheat germ lectins on human erythrocyte membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**: 540-549, 1975.
- [190] UKENA T. E., BORYSENKO J. Z., KARNOVSKY M. J., BERLIN R. D., Effects of colchicine, cytochalasin B and 2 - deoxyglucose on the topographical organization of surface - bound Concanavalin A in normal and transformed fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **61**: 70-82, 1974.
- [191] Van WAUWE J. P., LOONTIENS F. G., DE BRUYNE C. K., The interaction of *Ricinus communis* hemagglutinin with polysaccharides and low molecular carbohydrates, *Biochim. Biophys. Acta*, **313**: 99-105, 1973.
- [192] VILLAFRANCA J. J., VIOLA R. E., The use of <sup>13</sup>C spin lattice relaxation times to study the interaction of  $\alpha$  - methyl - D - glucopyranoside with Concanavalin A, *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**: 465-468, 1974.
- [193] WAGNER M., Reinigung ferritin - markierter Antikörper durch Gelfiltration an Agarose, *Naturwissenschaften*, **54**: 444, 1967.
- [194] WAGNER M., ROTH J., WAGNER B., Darstellung der Blutgruppensubstanzen A und B auf menschlichen Erythrozyten mit der Immunferritin - und der Immunokolloid - Technik. Untersuchungen an Ultradünnschnitten und mit der Gefrierätzung. 4. Arbeitstagung "Markierte Antikörper", Berlin, 1975
- [195] WALDSCHMIDT - LEITZ E., KELLER L., XX. Mitteilung über Samenproteine. Zur Wirkungsweise des Hämagglutinins aus Rizinus, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**: 945-950, 1969.
- [196] — XXII. Mitteilung über Samenproteine. Über Toxin und Agglutinin aus Rizinus: Reinigung und Zusammensetzung, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**: 990-994, 1970.
- [197] WALLACE E. F., LOVENBERG W., Studies on the carbohydrate moiety of dopamine  $\beta$  - hydroxylase: interaction of the enzyme with Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**: 3217-3220, 1974.
- [198] WANG J. L., CUNNINGHAM B. A., EDELMAN G. M.; Unusual fragments in the subunit structure of Concanavalin A, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 1130-1134, 1971.
- [199] WHITEHEAD J. S., WEITZ M.A., KIM Y. S., Differential binding to Sepharose - Con A of B<sub>12</sub> - binding proteins from human gastric juice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**: 777-779, 1975.
- [200] WIEDMER T., GENTINETTA R., BRODBECK U., Binding of acetylcholinesterases to Concanavalin A, *FEBS Letters*, **47**: 260-263, 1974.
- [201] WINQUIST L., ERIKSON L. C., DALLNER G., Binding of Concanavalin A - Sepharose to glycoproteins of liver microsomal membranes, *FEBS Letters*, **42**: 27-31, 1974.
- [202] WINZLER R. J., Carbohydrates in cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **29**: 77-102, 1970.
- [203] WRIGHT C. S., KEITH C., NAGATA Y., BURGER M. M., LANGRIDGE R., A preliminary crystallographic study of wheat germ agglutinin, *J. Mol. Biol.*, **87**: 843-846, 1974.
- [204] YARIV J., KALB A. J., LEVITZKI A., The interaction of Concanavalin A with  $\alpha$  - methyl - D - glucopyranosides, *Biochim. Biophys. Acta*, **165**: 303-305, 1968.
- [205] YOUNG N. M., LEON M. A., TAKAHASTI T., HOWARD I. K., SAGE H. J., Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. III. Reactions of *Lens culi-*

- naris* hemagglutinin with polysaccharides, glycoproteins, and lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1596-1601, 1971.
- [206] ZACHARSKI L. R., ROSENSTEIN R., PHILLIPS P. G., Concanavalin A inhibition of tissue factor (thromboplastin) activity, *Blood*, **44**: 783-787, 1974.
- [207] ZACHOWSKI A., PARAF A., Use of Concanavalin A polymer to isolate right side - out vesicles of purified plasma membranes from eukaryotic cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**: 787-792, 1974.
- [208] ZANETTA J. P., GOMBOS G., Affinity chromatography on Con A-Sepharose of synaptic vesicle membrane glycoproteins, *FEBS Letters*, **47**: 276-278, 1974.
- [209] ZANETTA J. P., MORGAN I. G., GOMBOS G., Synaptosomal plasma membrane glycoproteins: fractionation by affinity chromatography on Concanavalin A, *Brain Res.*, **83**: 337-348, 1975.

*Received: March 11th, 1976.*

*Accepted: March 20th, 1976.*

*Author's address: Ziegelmuehlenweg 1, 69 Jena, DDR.*



## METODY ZNAKOWANIA POWIERZCHNI KOMÓREK \*

Jerzy KAWIAK

Pracownia Cytofizjologii Zakładu Biofizyki i Biomatematyki,  
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

*Streszczenie.* Przedstawiono sposoby znakowania powierzchni komórek przez dołączenie znacznika wiązaniami kowalencyjnymi. Opisano nieenzymatyczne metody wiązania z grupami aminowymi, tyrozyłowymi, histydyłowymi i sulfhydryłowymi oraz metodę znakowania trytem końcowych reszt sjałowych. Ponadto przedstawiono zalety i problemy metodyczne znakowania katalizowanego enzymami: laktopero-ksydazą i oksydazą galaktozy. Pierwszy z tych enzymów pozwala wprowadzić jod radioaktywny do reszt tyrozyłowych i histydyłowych dostępnych na powierzchni komórek. Komórki dobrze przeżywają tę procedurę znakowania i rosną w hodowli. Oksydaza galaktozy katalizuje utlenienie końcowych galaktóz i N-acetylogalaktozoamin przy węglu-6, dostępnych na powierzchni komórki. Powstałe grupy aldehydowe są wtórnie redukowane trytowanym borowodorkiem, przez co tryt zostaje wprowadzony do reszty cukrowcowej.

Zgodnie z współczesnymi poglądami na budowę błon biologicznych [11, 11a, 76], mogą one wykazywać istotne różnice strukturalne. Nawet tej samej błonie nie można przypisać określonej stałej budowy, ale wiele zmieniających się form. Tak np. błona komórkowa prawdopodobnie może przybierać różne konfiguracje, w których jest różne ułożenie białek i lipidów, co mogłoby zmieniać możliwości funkcjonalne błony. Taka zmienność form błony komórkowej powiązana ze zmianami funkcji nie powinna dziwić ponieważ wiemy, że układ ten jest utrzymywany słabymi wzajemnymi oddziaływaniami składników. Stąd łatwo ulega zaburzeniu równowaga dynamiczna osiągnana przez układ, powodując przejście jednej formy błony w drugą. W tym sensie możemy uważać błonę za „płynną mozaikę” jej składników.

\* Praca wykonana w ramach programu badawczego nr 5-536-3 Urzędu Ochrony Środowiska USA.

Głównymi składnikami błon biologicznych są białka, lipidy, jony i woda. Niektóre z nich są substancjami amfipatycznymi, w których przynajmniej jedna okolica cząsteczki ma właściwości hydrofilne oraz inna — hydrofobowe. Ta ich budowa powoduje, że mogą tworzyć micelle w formie niestabilnych dwu- albo wielowarstwowych błon. Stanowią podstawowe składniki błon, bez których układ ten prawdopodobnie nie mógłby istnieć.

Nie wszystkie zmiany położenia substancji amfipatycznych w błonie są równie prawdopodobne. Mało prawdopodobna jest np. rotacja cząsteczki białka — z wyraźnie zaznaczoną hydrofilną okolicą wystającą na powierzchni komórki oraz zanurzoną w warstwie lipidowej okolicą hydrofobową — wokół osi równoległej do powierzchni błony. Natomiast rotacja wokół osi prostopadłej do powierzchni błony była obserwowana dla rodopsyny, białka występującego w pręcikach komórek siatkówki oka [17]. Dla małych cząsteczek fosfolipidów czas połowiczny wymiany między powierzchniową i wewnętrzną warstwą lipidową (tzw. ruch flip-flop) jest rzędu minut lub godzin [43, 50]. Cukrowcowe grupy dołączone od strony powierzchni komórki do białek i lipidów błony pełnią m. in. funkcję stabilizatora położenia tych cząsteczek. Tę stabilność położenia cząsteczek w błonie można wykorzystać dla obserwacji pewnych grup chemicznych należących do białek i lipidów w pobliżu powierzchni komórki, wnioskując stąd o chwilowej obecności tych składników na powierzchni komórki. Dotyczy to również sztucznie otrzymanych pęcherzyków utworzonych z fragmentów rozerwanej błony komórkowej albo błon cytoplazmatycznych. W tym przypadku można śledzić obecność grup chemicznych na zewnętrznej powierzchni pęcherzyków. Informacje na temat ułożenia składników na powierzchni błon biologicznych mają istotne znaczenie dla rozumienia takich funkcji błony, jak rozpoznawanie bodźców (hormony, wirusy, przeciwciała), transport przez błony (nośniki) czy sterowanie wewnętrznymi procesami komórkowymi.

W obecnym przeglądzie będą przedstawione niektóre sposoby znakowania powierzchni błon, a raczej dostępnych na ich powierzchni grup chemicznych należących do białek i lipidów. Mimo że większość przykładów jest ograniczona do błony komórkowej, przedstawione ogólne wyniki i wnioski mają również zastosowanie do sztucznych pęcherzyków utworzonych z błon biologicznych. W obecnym przeglądzie bardziej szczegółowe opisy składników powierzchni komórek, np. dotyczące antygenów czy receptorów dla hormonów, inhibitorów i lektyn, nie będą poruszane.

Wybrano metody, w których znacznik jest trwale, kowalencyjnie związany ze składnikami powierzchni błony. Czasem wyraźnie modyfikuje to czynności błony komórkowej, chociaż nie powinno prowadzić



do rychłego obumarcia całej komórki. Ma to pewne wady i zalety, które zostaną omówione.

Metody znakowania powierzchni całych, nienaruszonych komórek opierają się na tym założeniu, że grupy chemiczne składników błony są dostępne dla odczynnika wprowadzającego znacznik i jest on aktywny tylko od strony środowiska. Odczynnikami, które spełniają wymagane właściwości, są duże aniony oraz cząsteczki białek enzymatycznych. Stąd ogólnie można wyróżnić metody znakowania nieenzymatyczne i metody enzymatyczne. Jak wspomniano, dodatkowym wymaganiem są takie warunki reakcji chemicznej, by podczas znakowania nie doszło do uszkodzenia komórek. Między innymi sprzyja temu krótki czas potrzebny do znakowania. Odczynniki wykorzystywane do znakowania zebrano w tabeli.

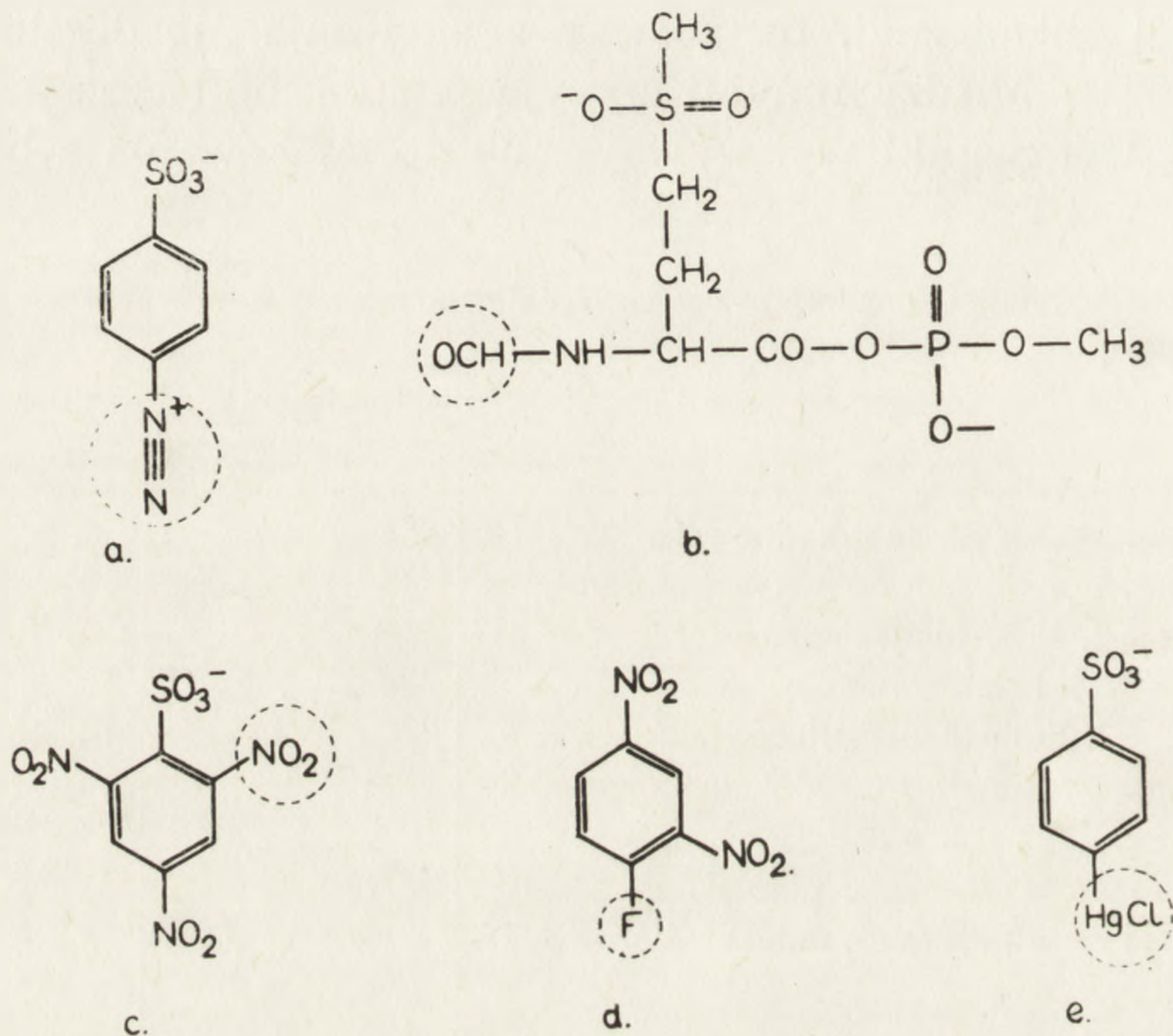
TABELA. Metody znakowania powierzchni komórek

Metody	Znacznik	Literatura
Nieenzymatyczne:		
dwuazoniowa sól kwasu sulfanilowego	$^{35}\text{S}$	5, 6
formylometionilo sulfono metylofosforan	$^{35}\text{S}$	10
1-sulfono 2, 4, 5-trójnitrobenzen	$^3\text{H}$	2, 9
1-fluoro 2, 4-dwunitrobenzen	$^{14}\text{C}$	69
pochodne 2, 2'-dwuhydrostilbeno sulfonianu	$^{14}\text{C}$ , $^{125}\text{I}$	14, 46
fosforan pirydoksalu — redukcja borowodorkiem	$^3\text{H}$	39, 72
1-sulfono 4-rtęciobenzenu chlorek	$^{203}\text{Hg}$	42
utlenianie nadjodanem — redukcja borowodorkiem	$^3\text{H}$	8
imidoestry	$^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$	91
chlorek dansylu	$^3\text{H}$	75
Enzymatyczne:		
jodowanie katalizowane laktoperoksydazą	$^{125}\text{I}$ , $^{131}\text{I}$	36, 63, 65
utlenianie katalizowane oksydazą galaktozy — wtórna redukcja borowodorkiem	$^3\text{H}$	26, 77

## ZNAKOWANIE NIEENZYMATYCZNE

W metodach nieenzymatycznych znacznik najczęściej wiąże się z resztami histydyłowymi i wolnymi grupami aminowymi oraz guanidylowymi białek. Większość grup aminowych na powierzchni komórek należy do białek, a nie do lipidów [11, 91]. Odczynnikiem łączącym się z tymi grupami jest dwuazoniowa sól kwasu ( $^{35}\text{S}$ ) sulfanilowego (rys. 1a) użyta do znakowania powierzchni erytrocytów [5, 6, 40]. Działanie tym odczynnikiem powoduje natychmiastową utratę jonów potasowych przez komórkę, co dowodzi znacznego uszkodzenia błony komórkowej.

Jedną z wcześniej opracowanych metod było również znakowanie powierzchni erytrocytów formylometionylo ( $^{35}\text{S}$ ) sulfono metylofosforanem (rys. 1b), które wykonuje się w wysokim pH (około 10). Według autora tej metody Bretchera [10] do całych, nieuszkodzonych erytrocytów związek ten przenika słabo, a mimo to około 15% radioaktywności całych komórek odnajduje się w hemoglobinie. Erytrocyty dobrze znoszą wysokie pH, w którym prowadzi się znakowanie i zwykle nie więcej niż 5% komórek ulega hemolizie.

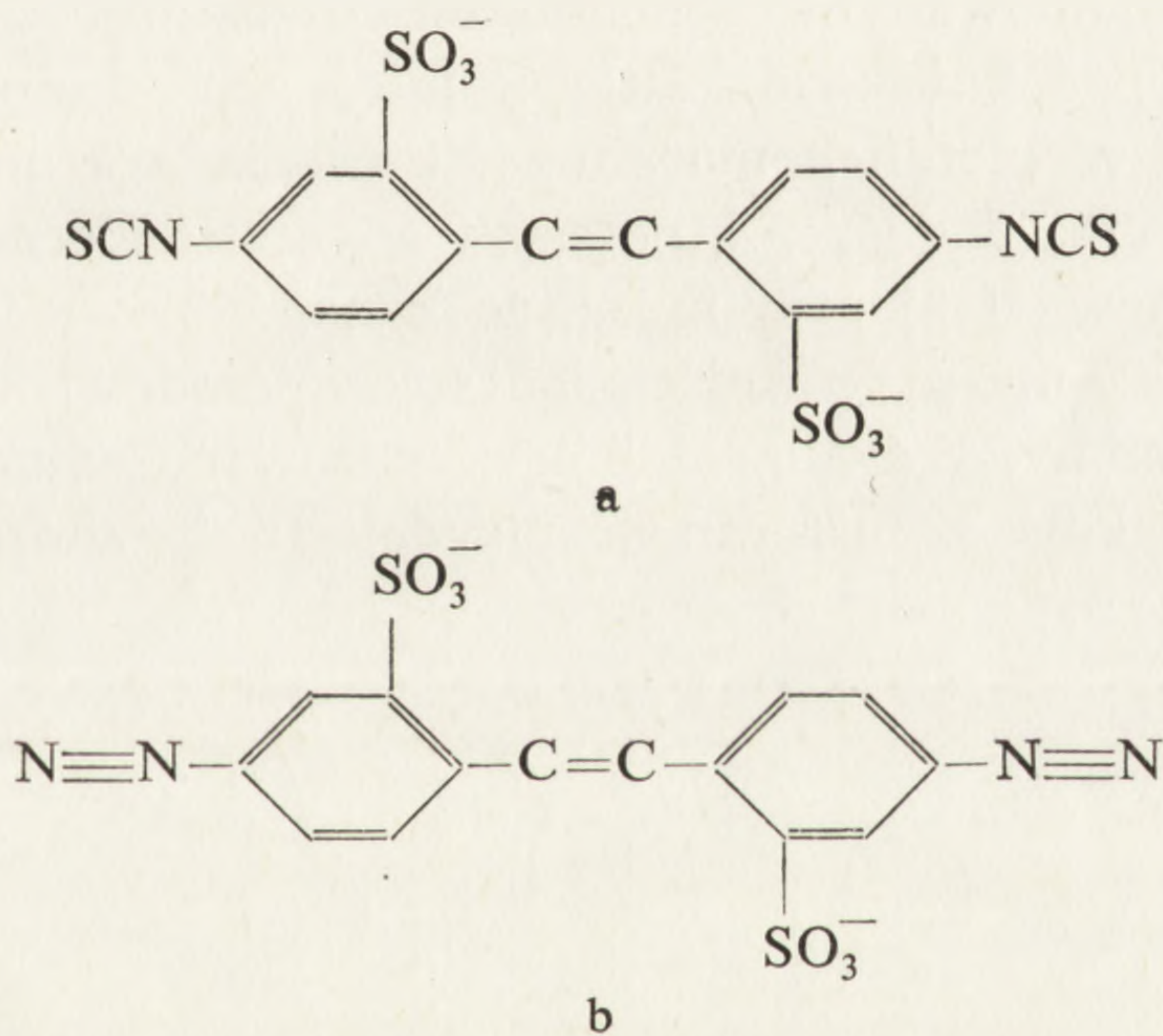


Rys. 1. Wzory odczynników używanych do znakowania powierzchni komórek. Grupy reaktywne obwiedziono linią przerywaną. a — dwuazoniowa sól kwasu sulfanilowego, b — formylometionylo sulfono metylofosforan, c — 1-sulfono 2,4,6 - trójnitrobenzen, d — 1 - fluoro 2,4 - dwunitrobenzen, e — 1 - sulfono 4 - ręcio-benzenu chlorek.

Do znakowania powierzchni erytrocytów próbowano wykorzystać 1-sulfono 2,4,6-trójnitrobenzen (TNBS) [2, 9]. Odczynnik ten (rys. 1c) reaguje z grupami sulfhydrylowymi oraz z grupami aminowymi peptydów i białek [24, 58]. Jednak wykazano [3], że znakowanie odbywa się podczas dyfuzji odczynnika do komórki. Stąd znakowane jest również wewnątrz błony komórkowej i hemoglobina erytrocytów, a nie tylko powierzchniowe składniki. Ten odczynnik użyto również do oddzielenia białek błon erytrocytów na zasadzie chromatografii powinowactwa [84]. Z Sepharozą łączono przeciwciała przeciw dwunitrofenylo-wym związkom i na kolumnie z takiej Sepharozy zatrzymywano, a na-

stępnie eluowano białka solubilizowanych błon otrzymanych z komórek znakowanych TNBS.

Berg i wsp. [7] traktowali erythrocyty 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzenem (FDNB) (rys. 1d) oraz jego analogiem z dwoma grupami aktywnymi: 1,5-dwufluoro-2,4-dwunitrobenzenem. Zwiększają one przepuszczalność erythrocytów dla kationów sodu i potasu, a Passow i Schnell [59] odkryli, że FDNB powoduje również zmniejszoną przepuszczalność błony dla anionów siarczanowych. FDNB może wiązać się z różnymi grupami: aminowymi, imidazolowymi, sulfhydryłowymi i fenolowymi, co z kolei może wpływać na zmianę trzeciorzędowej budowy białek, w tym również białek błony komórkowej. Odczynnik ten jest dobrze rozpuszczalny w lipidach i stąd szybko wnika do błony oraz do komórki, reagując z białkami i lipidami wewnętrznymi [69]. Ma więc małą wartość w badaniach grup chemicznych dostępnych na powierzchni, chociaż używając go zyskano wiele informacji na temat biernego transportu anionów przez błonę komórkową [60].



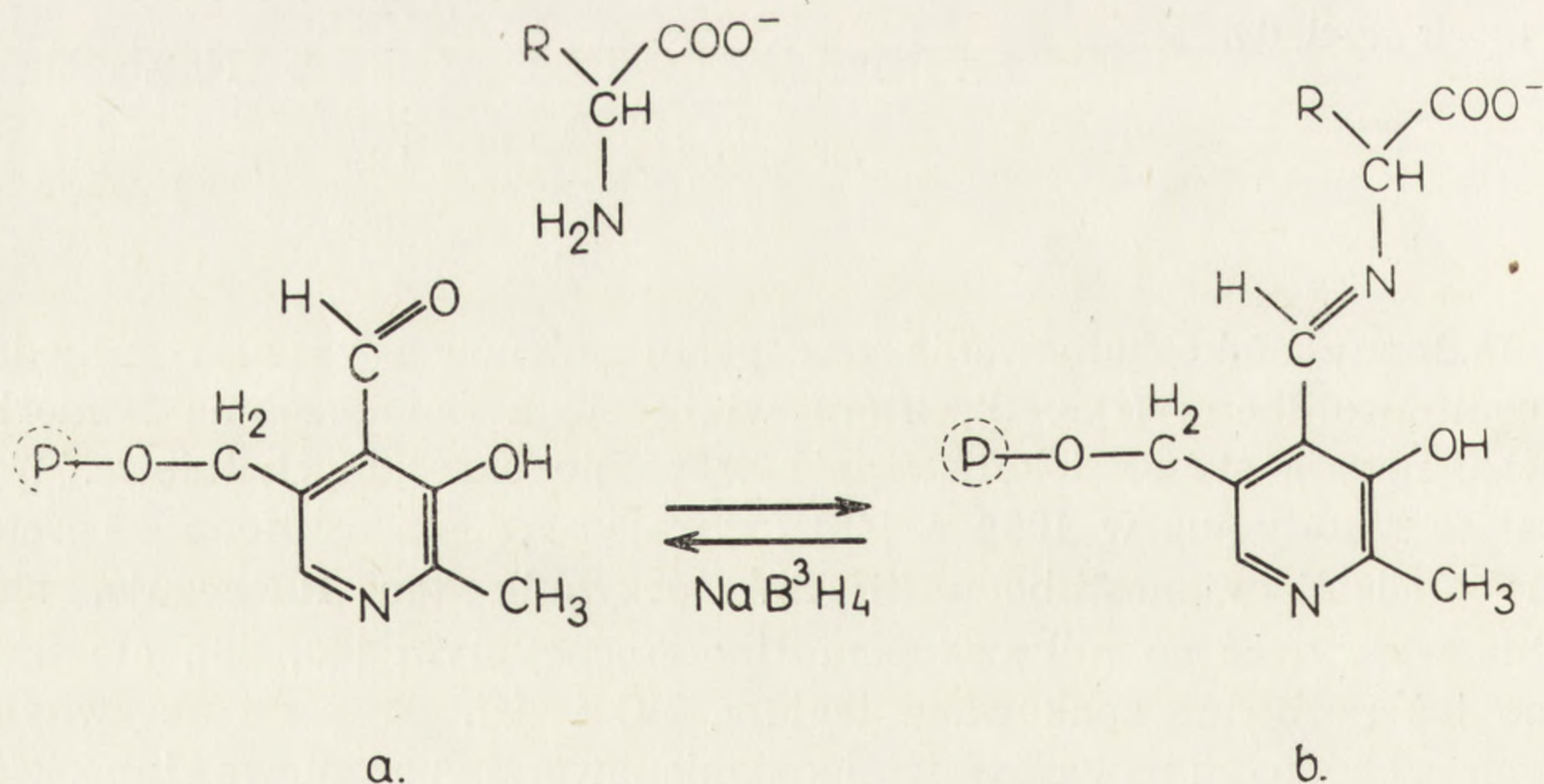
Rys. 2. Wzór 2,2'-dwydrostilbeno dwusulfonianu z reaktywnymi grupami w pozycjach 4,4' - : dwuizotiocyanianowymi (a) albo dwuazoniowymi (b).

Podobny efekt hamowania transportu anionów wykazują pochodne dwusulfonostilbenu (rys. 2), które wiążą się z powierzchnią komórki, a więc nadają się do lokalizowania w błonie określonych miejsc. Wykazał to Maddy już w 1964 r. [46] używając 2,2'-dwusulfono 4-acetamidu 4'-izotiocyanostilbenu (SITS). Odczynnik ten fluoryzuje, stąd można wykrywać go mikroskopem fluorescencyjnym [46, 49], ale używano też pochodne znakowane trytem,  $^{14}\text{C}$  i  $^{125}\text{I}$ . Grupami aktywnymi w tych pochodnych mogą być izotiocyanianowa, dwuazoniowa i inne, które służą do wiązania odczynnika z grupami aminowymi, histydyłowymi, guanidyłowymi, sulfhydryłowymi i tyrozyłowymi dostępnymi na powierzchni komórek [23]. Wiązanie to jest dwu typów: silne, prawdo-

podobnie kowalencyjne, oraz słabe [14]. Znakowane komórki płukane roztworami zawierającymi białko tracą tę część odczynnika, która jest przyłączona słabymi wiązaniami. W przypadku niektórych pochodnych prawie cały znacznik daje się w ten sposób wypłukać, ale inne, np. dwuizotiocyanowa pochodna (4,4' - dwuizotiocyanano - 2,2' - stilbeno dwusulfonian = DIDS), pozostają związane w tych warunkach. Reakcja tej ostatniej pochodnej jest szybka i całkowite związane następuje po 2 min. w temp. 0°C. Jeżeli pochodna była znakowana trytem, to cały izotop związany w błonach daje się wytrącić kwasem trójchlorooctowym, a około 15% ekstrahuje się rozpuszczalnikami lipidów. Stąd wniosek, że zarówno białka, jak i lipidy są znakowane.

Większość znakowanych komórek pozostaje żywych w testach z błękitem trypanu i dobrze rosną one w hodowli. Udało się wykazać, że 90% radioaktywnego DIDS wiąże się z jednym białkiem błony erytrocytów o masie cząsteczkowej 95 000 [13]. Widocznie temu białku można przypisać funkcję we wspomnianym już transporcie anionów siarczanowych hamowanym pochodnymi dwusulfono stilbenu. Odczynniki te prawdopodobnie oddziałują z miejscami o dodatnich ładunkach związanych w błonie komórkowej, które są ważne dla transportu anionów [60]. Warto dodać, iż hipotezy transportu biernego kationów przez błonę komórkową [33] przyjmują, że kanał odpowiedzialny za przenikanie jonów  $\text{Na}^+$  ma przy wejściu od strony środowiska związany z błoną ładunek ujemny, prawdopodobnie zjonizowaną grupę karboksylową.

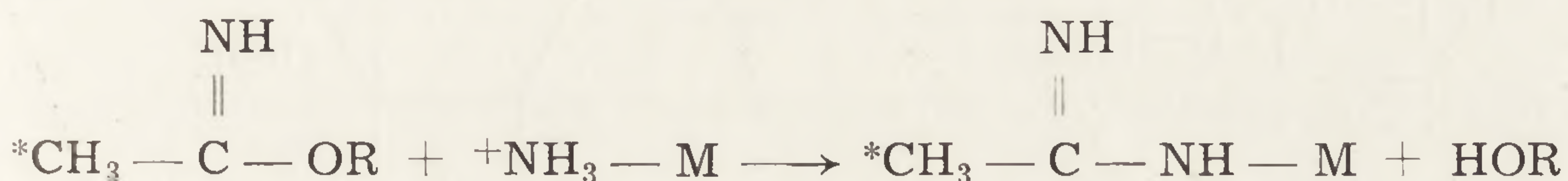
Reakcja z fosforanem pirydoksalu i wtórna redukcja trytowany



Rys. 3. Reakcja fosforanu pirydoksalu z grupą aminową lipidu lub białka prowadzi do powstania zasady Schiffa. Ten produkt reakcji może być zredukowany borowodorkiem trytowanym, celem wprowadzenia trytu do cząsteczki lipidu lub białka.

borowodorkiem (rys. 3) przebiega prawdopodobnie przez etap zasad Schiffa [16]. Była ona wykorzystana do znakowania powierzchniowych białek wirusa grypy oraz komórek chomika i myszy hodowanych *in vitro* [39, 72]. Według założeń, fosforan pirydoksalu obdarzony ładunkiem powinien słabo przenikać przez błonę komórkową i reagować głównie z dostępnymi od strony środowiska grupami aminowymi białek, ewentualnie lipidów. W praktyce warunek ten nie jest ściśle spełniany [39] i w autoradiogramach obserwuje się znakowanie jąder wielu komórek. Znakowanie nie jest trwałe i komórki wytrącone kwasem trójchlorooctowym zachowują zaledwie 10% izotopu. Prawdopodobnie przyłączony do grup aminowych tryt łatwo wymienia się w środowisku kwaśnym i to jest przyczyną utraty znakowania. Konieczna jest kontrola bez fosforanu pirydoksalu, bo sam borowodorek znakuje lipidy i inne substancje w komórce.

Imidoestry reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi (rys. 4) w stosunkowo łagodnych warunkach. Wykorzystano je do loka-



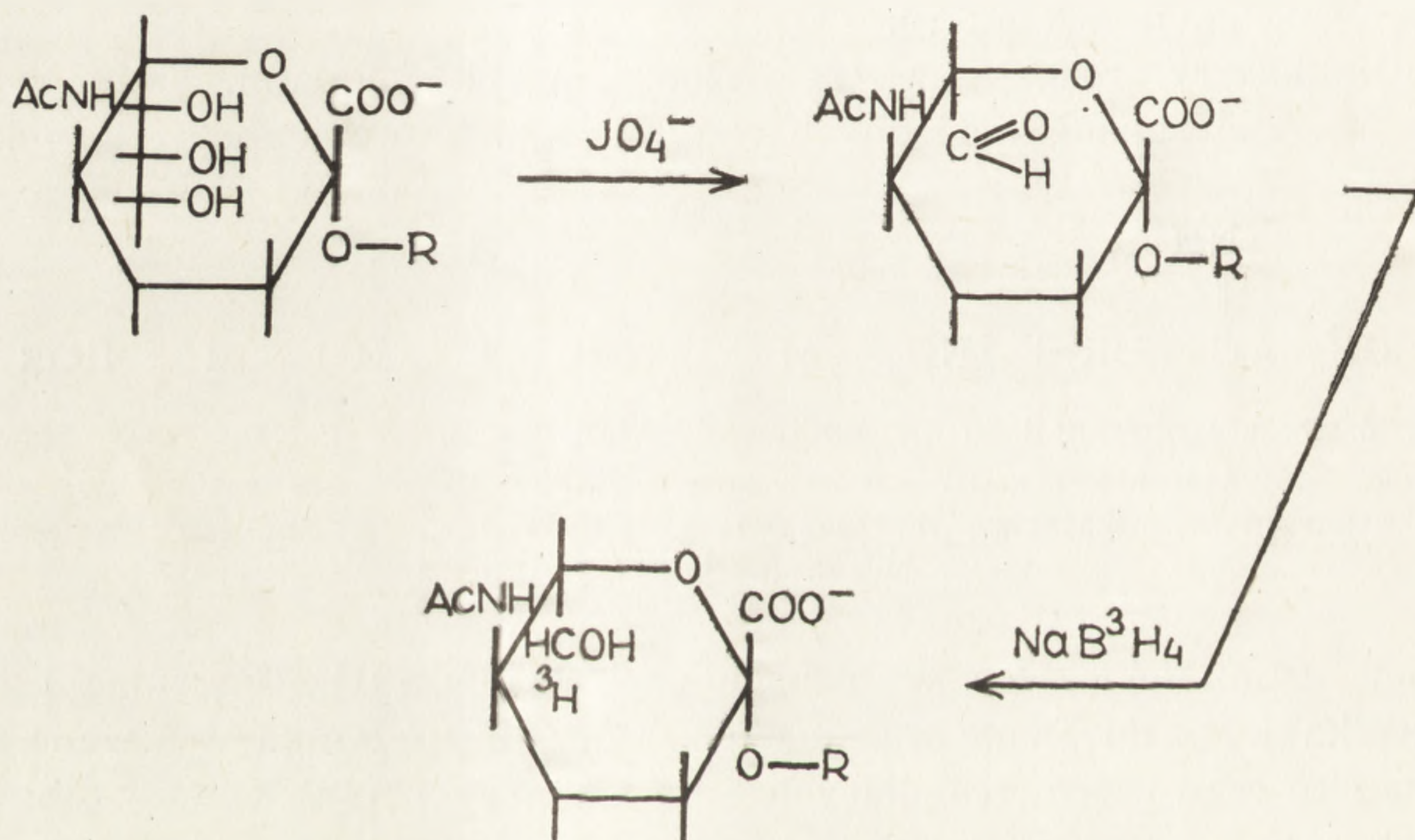
Rys. 4. Przebieg reakcji grupy aminowej składnika błony ( $+NH_3-M$ ) z imidoestrem. Grupa aminowa estru jest znakowana  $^3H$  albo  $^{14}C$ , co zaznaczono gwiazdką. Dla estru nieprzenikającego do błony  $R = -CH_2CH_2SO_4^-$ , a dla estru przenikającego  $R = -CH_2CH_3$ .

lizacji grup aminowych w błonach erytrocytów [91]. Używając estru przenikającego do błony oraz takiego, który nie przenika wykazano, że ponad 10 razy więcej reagujących grup aminowych białek błony jest na powierzchni cytoplazmatycznej niż od strony środowiska. Prawie wszystkie grupy aminowe lipidów są na powierzchni cytoplazmatycznej.

Dotąd opisane odczynniki wiązały się głównie z grupami aminowymi białek i lipidów. Stosowano też odczynniki, które wiązały się z grupami sulfhydryłowymi białek. Wykorzystanie odczynników znanych z chemii białek, takich jak: p-chlorortęciowy benzoesan, N-etylomaleimid [44] czy 1-bromortęciowo-2-hydroksypropan, ma ograniczone zastosowanie, ponieważ cząsteczki ich są stosunkowo dobrze rozpuszczalne w lipidach i mogą wnikać do komórek. Większe nadzieje może budzić 1-sulfono-4-rtęciobenzenu chlorek (rys. 1e) (PCMPS) ze względu na wolne przenikanie do komórek [82]. Powoduje on wzrost przepuszczalności błony erytrocytów dla kationów, ale bezpośrednio nie wpływa na przepuszczalność anionów [42]. Podobny odczynnik (p-chlorortęciowy benzoesan) związany z nośnikiem aminoetylopoliglukozy o masie cząsteczkowej 250 000 zastosował Ohta i wsp. [57], obserwując w całych

komórkach hamowanie wrażliwej na ouabainę ATPazy zależnej od sodu i potasu. p-chlorortęciowy benzoesan związany z dekstranem o masie 10 000 daltonów posłużył też do lokalizacji na powierzchni komórek trzustki grup -SH, istotnych dla wydzielania pobudzanego sekretyną oraz glukozą [92].

Opisywano również metodę, która wprowadza radioaktywny znacznik do sjałoglikoproteidów. Według autorów [45] polega ona na utlenianiu końcowych reszt sjałowych działaniem kwasu nadjodowego oraz późniejszej redukcji trytowanym borowodorkiem powstałych w pierwszym etapie grup aldehydowych (rys. 5). Metodę tę zastosowano do znakowania sjałoglikoproteidów błon erytrocytów [8]. Około 18% radioaktywności błon erytrocytów jest związane z lipidami.



Rys. 5. Utlenienie reszty kwasu sjałowego nadjodanem i wtórna redukcja borowodorkiem trytowanym wprowadza znacznik do cząsteczki.

Opisano również użycie odczynników przenikających do błony i do komórki, ale znakujących białka błony komórkowej na innej zasadzie. Protony niełatwo przenikają przez błonę, dlatego pH wewnątrz komórki pozostaje stałe. Gdy jednak doda się do środowiska chlorek dansylu [75], który reagując z grupami  $-\text{NH}_2$  uwalnia protony, pH wewnątrz komórki szybko obniża się, pozostając niezmiennym na zewnątrz, gdzie jest odpowiednio buforowane dużą objętością środowiska. Szybkość reakcji zależy od liczby niepołączonych z protonem grup  $-\text{NH}_2$ , a więc od pH. Stąd reakcja biegnie około 100 razy wolniej wewnątrz komórki niż blisko jej powierzchni. Na podobnej zasadzie wykorzystuje się do znakowania bezwodnik kwasu octowego [15].

Można przyjąć, że wyniki znakowania powierzchni komórek odczynnikami o stosunkowo małej cząsteczce zależą nie tylko od słabej dyfuzji tych substancji przez błonę komórkową. Warto również zwrócić uwagę na możliwość reagowania tych odczynników ze składnikami powierzchni komórek lokalnie, w miejscu, gdzie przebiega proces znakowania. Ogólnie można powiedzieć, że bardzo często podczas znakowania nieenzymatycznego zachodzą w błonie komórkowej dość zasadnicze zmiany prowadzące do zaburzenia funkcji transportowych. Być może zależą one od zmian konformacji białek w błonie i wynikających stąd zmian interakcji między lipidami i białkami błony. Składniki są oznakowane, chociaż nie ma gwarancji, że dokładnie te same grupy były na powierzchni komórek przed rozpoczęciem znakowania. Zastanawiające jest jednak to, że na ogół te same białka są znakowane w erytrocytach człowieka różnymi technikami nieenzymatycznymi, co mogłoby dobrze świadczyć o rzetelności wyników.

Dużo łagodniejsze w stosunku do komórek wydają się metody, w których jako odczynniki używa się enzymów. Dwie z opracowanych metod chciałem przedstawić bardziej szczegółowo ze względu na częste ich stosowanie: metodę z laktoperoksydazą oraz z oksydazą galaktozy. Pierwsza z tych metod opracowana przez Phillipsa i Morrisona [63, 65, 66] zakłada, że enzym o dużym ciężarze cząsteczkowym nie wnika do wnętrza komórki przez nieuszkodzoną błonę i katalizuje włączanie jodu do reszt tyrozylowych albo histydylowych białek błony tylko od strony środowiska. Wydaje się, że jest to założenie słuszne, chociaż w pewnych warunkach enzym może być pobierany przez komórkę w drodze pinocytozy.

#### ENZYMATYCZNE JODOWANIE

Laktoperoksydaza jest hemoproteidem o masie cząsteczkowej 78 600, nie rozpadającym się na podjednostki i obecnym w mleku [54]. Bardziej szczegółowo badano aktywność katalizowania reakcji jodowania białka tym enzymem w przypadku cytochromu c z mięśnia sercowego wołu. Cytochron c ma w cząsteczce 4 reszty tyrozyłowe [22], ale metodami chemicznymi, tj. przy użyciu chloraminy T, udaje się jodować tylko dwie reszty tyrozyłowe znajdujące się w pozycjach 67 i 74 łańcucha polipeptydowego. Jodowanie cytochromu c przy użyciu laktoperoksydazy pozwala wprowadzić jod tylko do reszty tyrozyłowej 74 [48]. Przypuszczalnie reszta Tyr 67 nie jest dostępna dla enzymu jako głębiej schowana w cząsteczce. Potwierdzają to badania budowy cytochromu metodą ugięcia promieni rentgenowskich [22]. W ten sposób jodowanie lakto-

peroksydazą pozwala na określenie topografii reszt tyrozylowych w cząsteczce białka. Całkiem podobna sytuacja może istnieć na powierzchni komórek.

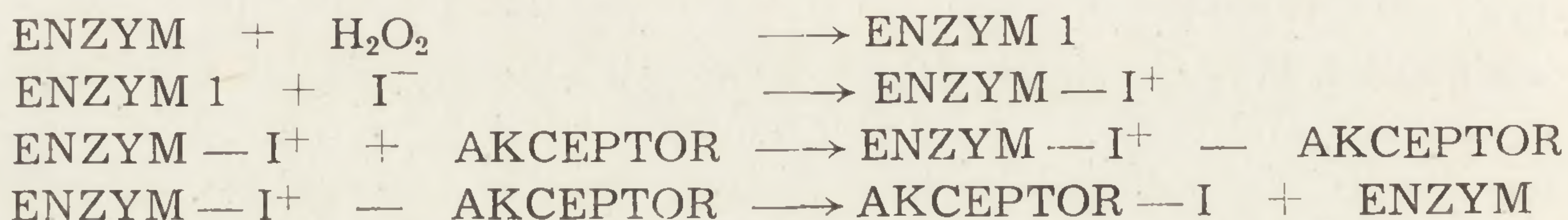
Do katalitycznego jodowania białek używano również innych peroksydaz, np. nierozpuszczalną pochodną mieloperoksydazy [22a]. Enzym ten nadaje się do znakowania izolowanych błon komórek wątrobowych (A. Dubin, N. Paczoska - Eljasiewicz, informacja osobista).

Wprowadzanie jodu katalizowane peroksydazą można ogólnie przedstawić wzorem:



Akceptorami mogą być różne cząsteczki: wolna tyrozyna albo reszty tyrozyłowe i histydyłowe w łańcuchach polipeptydowych. Pewne peroksydazy mogą przenosić również jony innych chlorowców na akceptory białkowe. Na przykład mieloperoksydaza otrzymana z obojętnochłonnych granulocytów i monocytów wytwarza aktywny chlor w roztworach soli fizjologicznej, co może prowadzić do denaturacji białek [92a] lub wbudowania chlorowca do jego cząsteczki [31].

Nie wszystkie reszty tyrozyłowe i histydyłowe białek na powierzchni komórki mogą być jodowane. Staje się to zrozumiałe po bliższym przyjrzeniu się przebiegowi reakcji na rys. 6. Według Hagera [31]



Rys. 6. Przebieg reakcji jodowania akceptora (reszty tyrozyłowej, histydyłowej) przy udziale laktoperoksydazy. Dla rozumowania objaśnionego w tekście ważny jest etap powstania kompleksu: enzym-I<sup>+</sup>-akceptor.

w pierwszym etapie reakcji z nadtlenkiem wodoru powstaje pośrednia substancja I z hydroksylową grupą przyłączoną do żelaza (Fe<sup>4+</sup>) porfiryny w enzymie. Potem w substancji 1 grupa hydroksylowa zostaje zastąpiona podjodanową (OI). W procesie tym anion jodkowy jest utleniany. Powstaje więc forma aktywnego enzymu, w której żelazo proto-porfiryny ma związany jod i stąd może on być przeniesiony na akceptor. Warunkiem jest jednak powstanie przejściowego kompleksu enzymu - I<sup>+</sup> z akceptorem. Ponieważ przeniesienie jodu zależy od powstania tego przejściowego kompleksu, dlatego może on być jedynie przyłączony do grup na powierzchni komórki dostępnych dla dużej cząsteczki enzymu. Przy rozpadzie kompleksu jod zostaje przeniesiony na akceptor.



Nadtlenek wodoru może również nieenzymatycznie utleniać jony jodkowe do jodu cząsteczkowego, konkurując z enzymem. Cząsteczki jodu mają hydrofobowy charakter i łatwo wnikają do błony, gdzie mogą nieenzymatycznie reagować z lipidami i fenyłowymi resztami białek oraz mogą przenikać przez błonę komórkową i w cytoplazmie rozpadać się na aniony jodkowe. Tym sposobem jodkowe jony pojawiają się w cytoplazmie komórki i tam mogą jodować białka, zwłaszcza jeżeli wewnątrz komórki są odpowiednie enzymy katalizujące ten proces. Wynika stąd, że warunkiem wstępnym dla prowadzenia skutecznego jodowania powierzchni komórek jest sprawdzenie, np. przez wykonanie odpowiednich reakcji histochemicznych [61], czy wewnątrz komórki znajdują się peroksydazy przenoszące jod. Z tej przyczyny granulocyty zawierające mieloperoksydazę nie nadają się do enzymatycznego jodowania ich powierzchni. Są jednak i takie komórki, które zawierają inhibitory peroksydaz [80]. Niskie stężenie  $I^-$  oraz duży nadmiar akceptora zapobiegają powstawaniu jodu cząsteczkowego.

Radioaktywność pochodząca od zaadsorbowanego na powierzchni komórek radioaktywnego enzymu jest bardzo mała [25, 36, 74].

Jodowane komórki mają jod związany z powierzchnią błony [25, 65, 66, 87], co potwierdzają badania autoradiograficzne [30, 81]. Przekonano się, że jest bardzo ważne, aby zaraz po znakowaniu usunąć z zawiesiny komórki, które były martwe w okresie znakowania [25]. Dobrym sposobem usunięcia tych komórek jest metoda wirowania w gradiencie Fikolu i metrizoatu [51]. Chodzi o to, aby pozbyć się komórek, do których przez uszkodzoną błonę wniknął enzym i katalitycznie znakował ich zawartość. Nawet mała domieszka tych czasem mocno znakowanych komórek może powodować istotne artefakty, co dobrze ilustruje następujące rozumowanie. Załóżmy, że w znakowanej populacji komórek 95% stanowią komórki żywe, do których nie wnika enzym. Załóżmy też, że białka w błonie komórkowej są znakowane w podobnym stopniu jak pozostałe białka i stanowią one około 1% białek komórki. Wtedy udział radioaktywności 95% komórek nie uszkodzonych w całej obserwowanej radioaktywności będzie wynosił  $1 \times 95 = 95$  jednostek. Udział zaś pozostałych 5% komórek uszkodzonych, w których wszystkie białka (100%) zostały znakowane będzie wynosił  $100 \times 5 = 500$  jednostek, czyli będzie on 5 razy większy niż w przypadku komórek nie uszkodzonych. Warto więc przypomnieć, że stosowany najczęściej test dla sprawdzenia żywotności komórek, test z błękitem trypanu ma nie większą dokładność niż  $\pm 2 - 3\%$ .

Bardzo często znakowane enzymatycznie komórki są wykorzystywane do badania frakcji białek powierzchniowych o dostępnych grupach reagujących. W tym celu po jodowaniu izotopem promieniotwórczym komórki są homogenizowane, a z homogenatu izoluje się frakcję mikro-

somową względnie wyodrębnioną frakcję „błon komórkowych”. Otrzymane frakcje są potem solubilizowane i poddawane elektroforezie w żelach poliakrylamidowych zawierających siarczan dodecyłu [90, 93]. Izotop znakujący powierzchnię komórki ułatwia izolowanie frakcji zawierającej błony komórkowe. Do oceny stopnia oczyszczenia błon zwykle wykorzystuje się markery enzymatyczne takie jak: 5' - nukleotydatazę, ATPazę zależną od sodu i potasu czy fosfatazę zasadową [21]. Aktywność tych enzymów zależy jednak nie tylko od ilości enzymu proporcjonalnej do zagęszczenia zawiesiny błon, ale również od inhibitorów i aktywatorów oraz innych czynników, które mogą być usuwane lub wprowadzane przypadkiem podczas procedury wyodrębniania błon. Ponadto aktywność tych enzymów w różnych komórkach, a nawet w różnych okolicach błony tej samej komórki mogą być różne. Znakowanie promieniotwórczym jodem całych komórek przed homogenizacją pozwala ominąć te niedogodności. Jod radioaktywny jest w tym przypadku dobrym wskaźnikiem oczyszczenia preparatu błon. Dla komórek L 1210 wykazano np. dobrą zgodność aktywności 5' - nukleotydatazy oraz radioaktywności w frakcjach homogenatu jodowanych komórek podczas wyodrębniania błon komórkowych (J. Kawiak, B. Miks — nie publikowane).

Warto też dodać, że w przypadku badania radioaktywnych frakcji białek powierzchniowych nie jest konieczne wyodrębnienie błon komórkowych od innych błon, które mogą znajdować się we frakcji mikrosomowej, np. błon śródplazmatycznych gładkich i szorstkich czy błon aparatu Golgiego. Możliwe są nawet rozdzielone frakcje białek powierzchniowych bez izolowania frakcji mikrosomowej, po solubilizacji całych komórek [30].

Jest zbyt dużo prac, w których wykorzystano metodę jodowania powierzchni komórek, by ich wyniki można tutaj omawiać. Pokróćce jednak wymienię grupy komórek, które były badane. Oprócz erytrocytów [36, 55, 63–67, 71], badano płytki krwi [4, 56, 62], różne komórki limfoidalne [18, 32, 47, 52, 74, 85, 88, 89], komórki tłuszczowe [19], komórki nowotworowe [25, 30, 51, 86], jak i hodowane *in vitro* komórki [32, 34, 35, 37–39, 68, 79, 87]. Oprócz znakowania komórek w zawieszynie, próbowano również znakować powierzchnię komórek nabłonkowych w całej tkance [81].

Przy okazji doświadczeń z komórkami L 1210 [25] poczyniono spostrzeżenia, które jak się wydaje są ważne również dla innych komórek. Intensywne płukanie komórek, szczególnie roztworami nie zawierającymi białek, może znacznie zwiększyć liczbę martwych komórek. Ponadto w przypadku komórek białaczki powoduje to dużą utratę izotopu do supernatantu. Ten izotop daje się wytrącać z supernatantu zimnym  $\text{HClO}_4$ , a strąt solubilizowany i rozdzielany w żelu poliakrylamidowym

daje białkowe szczyty radioaktywne podobne jak frakcja mikrosomowa. Można przypuszczać, że podczas płukania komórek z ich powierzchni odzielają się liczne drobne fragmenty błony komórkowej znakowane izotopem lub że znakowane białka są wypłukiwane.

Znakowane, drobne fragmenty błon komórkowych można otrzymać, gdy znakowane komórki L 1210 traktuje się roztworami hypotonicznymi.

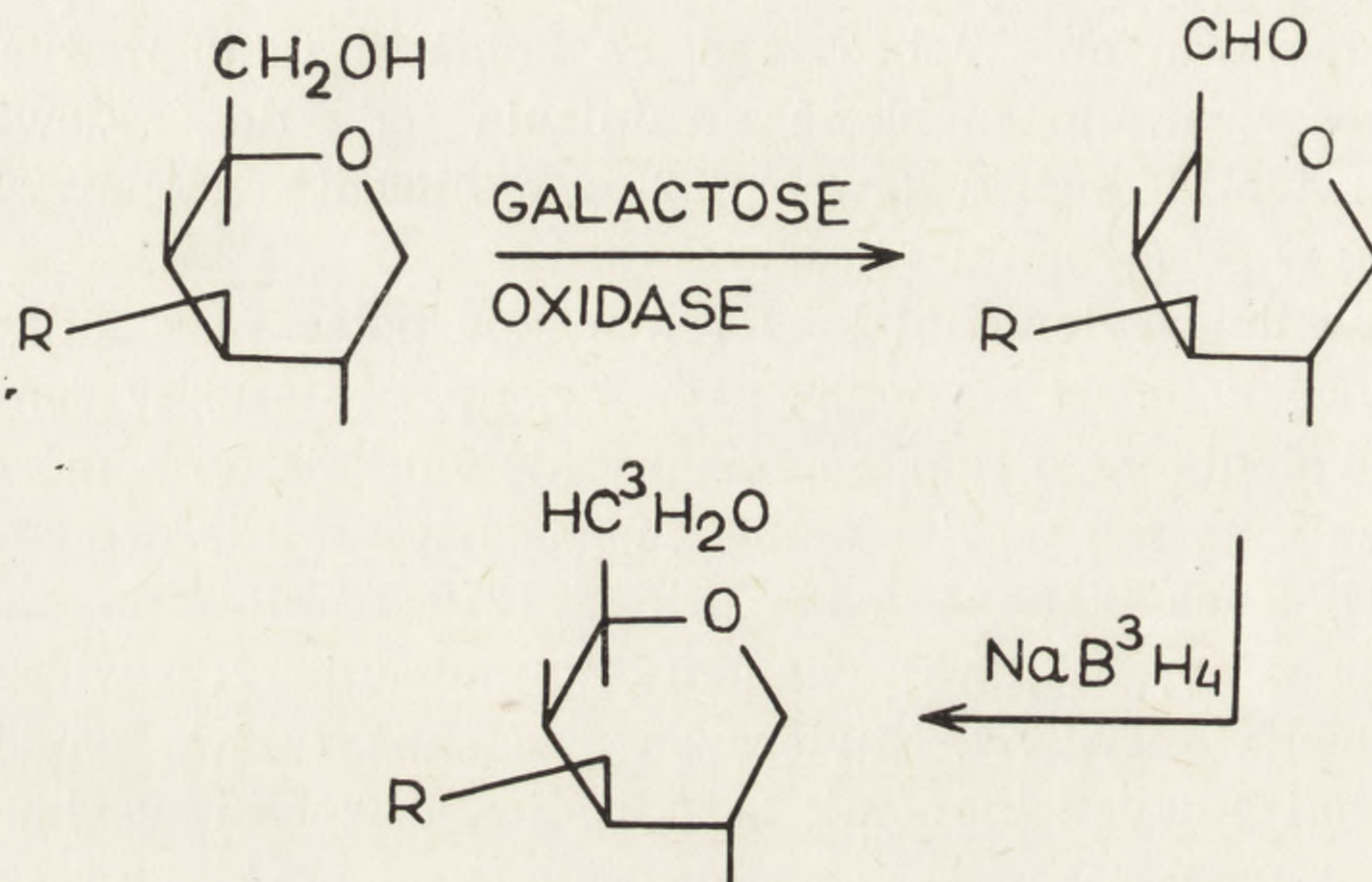
Inną sprawą jest szybkość utraty jodu związanego z powierzchnią komórek znakowanych. Wobec tego, że komórki takie można hodować *in vitro*, obserwowano szybkość uwalniania jodu do środowiska przez wiele godzin [35]. Komórki nawet po 20 godz. *in vitro* zachowywały około 45% izotopu w porównaniu z ilością wyjściową.

Znakowanie powierzchni komórek można połączyć z badaniem działania na żywe komórki różnych enzymów, np. proteaz. W tym przypadku dla upewnienia się o tym, że enzymy nie wnikają do komórek, a działają wyłącznie na ich powierzchnię, można używać nierozpuszczalne pochodne [41]. Znakowane  $^{125}\text{I}$  komórki L 1210 traktowano enzakrylową pochodną papainy, o której wiadomo, że uwalnia z powierzchni tych komórek pewne antygeny. Stwierdzono, że enzakrylowa papaina usuwa z powierzchni żywych komórek 31% radioaktywności w ciągu 45 min. w pokojowej temperaturze. Pozostała radioaktywność sedimentuje wraz z komórkami. Komórki po tej procedurze są żywe w teście z bromkiem etyldyny. Bardzo mało radioaktywności pozostaje w preparacie enzakrylowej papainy, około 0,5% po jednorazowym płukaniu preparatu. Sprawdzono też przed doświadczeniem, że enzym nie uwalnia się z nierozpuszczalnej pochodnej, a więc działa związany z dużymi cząstkami nośnika.

#### ZNAKOWANIE KATALIZOWANE OKSYDAZĄ GALAKTOZY

Metoda, w której wykorzystuje się do znakowania powierzchni komórek enzym oksydazę galaktozy została opisana przez Steck [77] oraz przez Gahmberga i Hakamori [26]. Również w tej metodzie zakłada się, że enzym o masie cząsteczkowej 75 000 [1] nie wnika do komórek nie uszkodzonych. Enzym ma dużą swoistość do galaktozy i N-acetylogalaktozaminy, których pierwszorzędowe grupy hydroksylowe przy węglu-6 są utleniane do grup aldehydowych (rys. 7). Końcowy cukier lub aminocukier związany z lipidami [70, 83] albo glikoproteidami [53] jest utleniany podobnie jak wolny cukier. W następnym etapie procedury znakowania grupy aldehydowe są redukowane przy użyciu trytowanego

borowodorku. W ten sposób tryt z borowodorku jest wprowadzany do reszt galaktozy i N-acetylogalaktozoaminy. Wykonując autoradiogramy przekonano się, że znakowana jest powierzchnia erytrocytów, a nie ich zawartość [26]. Oczywiście, tak jak w przypadku laktoperoksydazy, trytowane są reszty cukrowcowe na powierzchni komórek dostępne dla enzymu.



Rys. 7. Oksydaza galaktozy katalizuje utlenianie końcowej galaktozy (albo galaktozoaminy) przy węglu -6, a wtórna redukcja trytowanym borowodorkiem wprowadza  $^3\text{H}$  w to miejsce.

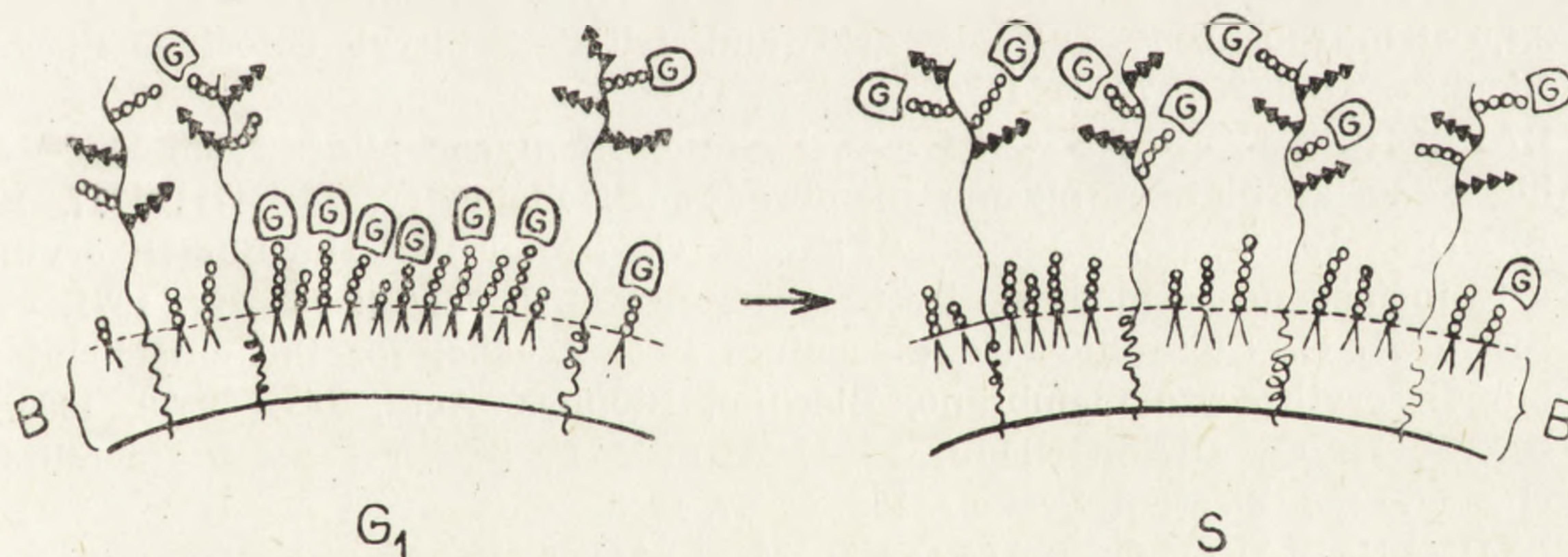
W rozdziałach elektroforetycznych solubilizowanych błon znakowanych erytrocytów można było stwierdzić obecność znakowanych lipidów, szczytu białkowego odpowiadającego głównemu glikoproteidowi błon erytrocytów oraz kilku mniejszych szczytów glikopeptydowych [26, 78]. Również i w tej metodzie wydaje się istotne podkreślenie, że komórki znakowane powinny być żywe, gdyż w przeciwnym przypadku enzym wnika do komórek, gdzie mógłby znakować składniki innych struktur niż błona komórkowa, np. błony aparatu Golgiego. Jednakże odwrócone stroną wewnętrzną na zewnątrz pęcherzyki otrzymane z błon erytrocytów są znakowane bardzo słabo [78], co przyjęto jako dowód na powierzchniową lokalizację reszt galaktozy w lipidach i białkach błony komórkowej.

Szczególnie intensywne znakowanie obserwuje się po uprzednim traktowaniu komórek neuraminidazą odsłaniającą dodatkowe końcowe galaktozy i N-acetylogalaktozoaminy [26]. Sugerowano, że traktowanie enzymem może powodować proteolizę w błonie, ale nie zaobserwowano

takiego procesu przy krótkich czasach inkubacji [39]. Łatwo również inaktywować aktywność proteazową, obecną w preparatach handlowo dostępnych neuraminidaz, ogrzewaniem rozcieńzonego roztworu enzymu do 50° przez 30 min [78].

W hodowanych *in vitro* komórkach nerek chomika (KBH) obserwowano zmiany intensywności znakowania błon komórkowych metodą z oksydazą galaktozy, podczas cyklu komórkowego [28]. Glikolipidy były maksymalnie znakowane w fazie G<sub>1</sub>, a minimalnie w fazie S, mimo braku zmian ilości badanych glikolipidów. Dowodzi to zmiennej organizacji powierzchniowych składników błony komórkowej w cyklu. Ponadto stwierdzono, że „galaktoproteid a” o masie cząsteczkowej około 200 000 [27, 29], występujący w błonach tych komórek, pojawia się w fazie G<sub>1</sub> cyklu i potem znakowanie jego stopniowo nasila się. Można by tłumaczyć to odsłanianiem dotąd niedostępnych reszt galaktozy połączonych z różnymi składnikami na powierzchni komórek, a wynikające z tego skutki ilustruje rys. 8. Komórki transformowane nie wykazują takich zmian znakowania podczas cyklu komórkowego, chociaż ogólna wydajność znakowania glikolipidów jest większa niż w komórkach nietrasformowanych.

Na podstawie prac zebranych w tym przeglądzie można sądzić, że czyniono wiele wysiłków, aby nie zaburzając fizjologicznego ułożenia składników powierzchniowych komórek oznakować je i dalej badać.



Rys. 8. Schemat zmian ułożenia glikolipidów i glikoproteidów na powierzchni komórek w różnych fazach cyklu ([28] trochę zmienione). Kółka oznaczają cukry o znanej budowie doczepione do lipidów powierzchniowej warstwy (zaznaczonych ogonkami): łańcuchy dwu, trzech, czterech, pięciu kółek przedstawiają ceramido dwu-, trzy-, cztero-cukry (globozydy) i pięciocukier (antygen Forssmana). Długie linie, mocno skręcone w obrębie błony są łańcuchami polipetydowymi. Są do nich doczepione cukry o znanej (kółka) lub nieznannej (trójkąty) budowie. Literą G zaznaczono końcowe reszty galaktozy albo galaktozoaminy, które można znakować trytem w reakcji katalizowanej oksydazą galaktozy po wtórnej redukcji borowodorkiem trytowanym

Większe sukcesy osiągnięto metodami, w których użyto enzymów dla wprowadzenia znacznika. Niewątpliwie metoda z użyciem laktoperoksydazy jest powszechnie wykorzystywana. Są również czynione pojedyncze próby wykorzystania innych enzymów do znakowania powierzchni komórek, np. z użyciem transferazy alfa-N-acetylogalaktozaminylowej [73], transaminazy glutaminianowej [12], transferazy sjalyłowej [20] i innych. Ten kierunek wydaje się obiecujący. Opisane metody znakowania czasem łączy się z działaniem innymi enzymami, np. działaniem proteaz na powierzchnię komórek. Wydaje się, że — mimo istniejących już doświadczeń w tej dziedzinie — tymi sposobami można będzie jeszcze zebrać wiele nowych informacji o zachowaniu się powierzchniowych składników komórek, szczególnie gdy użyje się nierozpuszczalnych pochodnych proteaz [25, 41]. Omówienie tych perspektyw przekroczyłoby ramy obecnego artykułu.

#### LITERATURA

- [1] AMARAL D., BERNSTEIN L., MORSE D., HORECKER B. L., Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*: A copper enzyme, *J. Biol. Chem.*, **238**: 2281–2284, 1963.
- [2] ARROTTI J. J., GARVIN J. E., Selective labeling of human erythrocyte components with tritiated trinitrobenzenesulfonic acid and picryl chloride, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 205–211, 1972.
- [3] — Reaction of human serum albumin and human erythrocytes with tritiated 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid and tritiated picryl chloride, *Biochim. Biophys. Acta*, **255**: 79–90, 1972.
- [4] BARBER A. J., JAMIESON G. A., Isolation of glycopeptides from low- and high density platelet plasma membranes, *Biochemistry*, **10**: 4711–4717, 1971.
- [5] BENDER W. W., GARAN H., BERG H. C., Proteins of the human erythrocyte membrane as modified by pronase, *J. Mol. Biol.*, **58**: 783–797, 1971.
- [6] BERG H. C., Sulfanilic acid diazonium salt: A label for the outside of the human erythrocyte membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **183**: 65–78, 1969.
- [7] BERG, H. C., DIAMOND J. M., MARFEY P. S., Erythrocyte membrane: chemical modification, *Science*, **150**: 64–67, 1965.
- [8] BLUMENFELD O. O., GALLOP P. M., LIAO T. H., Modification and introduction of a specific label into the erythrocyte membrane sialoglycoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**: 242–251, 1972.
- [9] BONSAI R. W., HUNT S., Reactivity of the human erythrocyte membrane to sodium trinitrobenzenesulphonate, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**: 281–284, 1971.
- [10] BRETSCHER M. S., Human erythrocyte membranes: Specific labeling of surface proteins, *J. Molec. Biol.*, **58**: 775–781, 1971.
- [11] — Membrane structure: some general principles, *Science*, **181**: 622–629, 1973.
- [11a] BRETSCHER M. S., RAFF M. C., Mammalian plasma membranes, *Nature*, **258**: 43–49, 1975.
- [12] BREWER G. J., SINGER S. J., On the disposition of the proteins of the

- membrane - containing bacteriophage PM 2, *Biochemistry*, **13**: 3580–3588, 1974.
- [13] CABANTCHIK Z. I., BALSHIN M., BREUER W., MARKUS H., ROTHSTEIN A., A comparison of intact human red blood cells and resealed and leaky ghosts with respect to their interactions with surface labelling agents and proteolytic enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **382**: 621–633, 1975.
- [14] CABANTCHIK Z. I., ROTHSTEIN A., The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives, *J. Membr. Biol.*, **10**: 311–330, 1972.
- [14a] CARRAWAY K. L., Covalent labeling of membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**: 379–410, 1975.
- [15] CARRAWAY K. L., KOBYLKA D., SUMMERS J., CARRAWAY C. A., Chemical modification of erythrocyte membranes: double labeling with acetic anhydride, *Chem. Phys. Lipids*, **8**: 65–81, 1972.
- [16] CHURCHICH J. E., Energy transfer in protein pyridoxamine - 5 - phosphate conjugates, *Biochemistry*, **4**: 1405–1410, 1965.
- [17] CONE R. A., Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane, *Nature New Biol.*, **236**: 39–43, 1972.
- [18] CONE R. E., MARCHALONIS J. J., Surface proteins of thymus derived lymphocytes and bone - marrow - derived lymphocytes, *Biochem. J.*, **140**: 345–354, 1974.
- [19] CZECH M. P., LYNN W. S., Studies on the topography of the fat cell plasma membrane, *Biochemistry*, **12**: 3597–3601, 1973.
- [20] DATTA P., Labeling of the external surface of hamster and mouse fibroblasts with <sup>14</sup>C sialic acid, *Biochemistry*, **13**: 3987–3991, 1974.
- [21] DePIERRE J. W., KARNOVSKY M. L., Plasma membranes of mammalian cells. A review of methods for their characterisation and isolation, *J. Cell Biol.*, **56**: 275–303, 1973.
- [22] DICKERSON R. E., TAKANO T., EISENBERG D., KALLAI O. B., SAMSON L., COOPER A., MARGOLIASH E., Ferricytochrome c. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1511–1535, 1971.
- [22a] DUBIN A., SILBERRING J., Catalytic iodination of proteins by horse myeloperoxidase in solid state, *Analyt. Biochem.* (w druku).
- [23] FRAENKEL - CONRAT J., FRAENKEL - CONRAT H. F., The essential groups of insulin, *Biochim. Biophys. Acta*, **5**: 89–97, 1950.
- [24] FREEDMAN R. B., RADDA G. K., The reaction of 2,4,6 - trinitrobenzene - sulphonic acid with amino acid peptides and proteins, *Biochem. J.*, **108**: 383–391, 1968.
- [25] GADOWSKA M., MIKS B., KAWALEC M., KAWIAK J., Radioiodination of L 1210 cells, *Folia Histochem. Cytochem.*, **13**: 11–20, 1975.
- [26] GAHMBERG C. G., HAKAMORI S. J., External labeling of cell surface galactose and galactosamine glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **248**: 4311–4317, 1973.
- [27] — Altered growth behaviour of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **70**: 3329–3333, 1973.
- [28] — Organization of glycolipids and glycoproteins in surface membranes. Dependency on cell cycle and on transformation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**: 283–291, 1974.

- [29] GAHMBERG C. G., KIEHN D., HAKAMORI S. J., Changes in surface-labeled galactoprotein and in glycolipid concentrations in cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus mutant, *Nature*, **248**: 413-415, 1974.
- [30] GATES R. E., McCLAIN M., MORRISON M. M., Surface peptides on intact Ehrlich ascites tumor cells, *Exptl. Cell Res.*, **83**: 344-350, 1974.
- [31] HAGER L. P., The mechanism of enzymatic halogenation and its relation to the labeling of cell surface structures, [w] *Membrane transformations in neoplasia*, red. J. Schultz, R. E. Block, Acad. Press, N. York, Londyn 1974, 27-32.
- [32] HAUSTEIN D., Effective radioiodination by lactoperoxidase and solubilisation of cell-surface proteins of cultured murine T lymphoma cells, *J. Immunol. Methods*, **7**: 25-38, 1975.
- [33] HILLE B., An essential ionized acid group in sodium channels, *Fed. Proc.*, **34**: 1318-1321, 1975.
- [34] HOGG N. M., A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **71**: 489-492, 1974.
- [35] HUANG C. C., TSAI C. M., CANELLAKIS E. S., Iodination of cell membranes. II. Characterisation of HeLa cell membrane surface proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **332**: 59-68, 1973.
- [36] HUBBARD A. L., COHN Z. A., The enzymatic iodination of the red cell membrane, *J. Cell. Biol.*, **55**: 390-405, 1972.
- [37] HYNES R. O., Alternation of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**: 3170-3174, 1973.
- [38] HYNES R. O., HUMPHRIES K. C., Characterization of the external proteins of hamster fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **62**: 438-448, 1974.
- [39] JULIANO R. L., BEHAR-BANNELIER M., An evaluation of techniques for labeling the surface proteins of cultured mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **375**: 249-267, 1975.
- [40] JULIANO R. L., ROTHSTEIN A., Properties of an erythrocyte membrane lipoprotein fraction, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**: 227-235, 1971.
- [41] KAWALEC M., Zmiany względnej ilości antygenów na powierzchni żywych komórek wywołane nierozpuszczalnymi pochodnymi proteaz, praca doktorska CMKP, 1975.
- [42] KNAUF P. A., ROTHSTEIN A., Chemical modification of membranes *J. Gen. Physiol.*, **58**: 190-210 i 211-223, 1971.
- [43] KORNBERG R. D., McCONNELL H. M., Inside-outside transition of phospholipids in vesicle membranes, *Biochemistry*, **10**: 1111-1120, 1971.
- [44] LENARD J., Protein components of erythrocyte membranes from different animal species, *Biochemistry*, **9**: 5037-5040, 1970.
- [45] vanLENTEN L., ASHWELL G., Studies on the chemical and enzymatic modification of glycoproteins. A general method for the tritiation of sialic acid-containing glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **246**: 1889-1894, 1971.
- [46] MADDY H., A fluorescent label for the outer components of the plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **88**: 390-399, 1964.
- [47] MARCHALONIS J. J., CONE R. E., ATWELL J. L., Isolation and partial characterisation of lymphocyte surface immunoglobulins, *J. Exper. Med.*, **135**: 956-971, 1972.
- [48] MARGOLIASH E., FERGUSON-MILLER S., TULLOSS J., KANG C. H.,



- FEINBERG B. A., BRAUTIGAN D. L., MORRISON M., Separate intramolecular pathways for reduction and oxidation of cytochrome c in electron transport chain reactions, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, **70**: 3245-3249, 1973.
- [49] MARINETTI G. V., GRAY G. M., A fluorescent chemical marker for the liver cell plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**: 580-590, 1967.
- [50] McNAMEE M. G., McCONNELL H. M., Transmembrane potentials and phospholipid flip-flop in excitable membrane vesicles, *Biochemistry*, **12**: 2951-2958, 1973.
- [51] MOLNAR J., KLEIN G., FRIBERG S., Jr., Subcellular localization of murine histocompatibility antigens in tumor cells. Localization of H-2 antigens, *Transplantation*, **16**: 93-102, 1973.
- [52] MOROZ C., HAHN Y., Cell-surface immunoglobulin of human thymus cells and its biosynthesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**: 3716-3720, 1973.
- [53] MORREL A. G., van den HAMER C. J., SCHEINBERG I. H., ASHWELL G., Physical and chemical studies on ceruloplasmin. IV. Preparation of radioactive sialic acid-free ceruloplasmin labeled with tritium on terminal D-galactose residues, *J. Biol. Chem.*, **241**: 3745-3749, 1966.
- [54] MORRISON M., GATES R. E., HUBER C. T., The use of lactoperoxidase as a molecular and macromolecular probe, [w] *Membrane transformations in neoplasia*, red. J. Schultz, R. E., Block, Acad. Press, N. York, Londyn 1974, 33-43.
- [55] MORRISON M., MUELLER T. J., HUBER C. T., Transmembrane orientation of the glycoproteins in normal human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2658-2660, 1974.
- [56] NACHMAN R. L., HUBBARD A., FERRIS B., Iodination of the human platelet membrane. Studies of the major surface glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **248**: 2928-2936, 1973.
- [57] OHTA H., MATSUMOTO J., NAGANO K., FUJITA M., NAKAO M., The inhibition of Na-K-activated adenosinetriphosphatase by a large molecule derivative of p-chloromercuribenzoic acid at the outer surface of human red cell, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **42**: 1127-1133, 1971.
- [58] OKUYAMA T., SATAKA K., On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl-amino acids and peptides, *J. Biochem. (Tokyo)*, **47**: 454-466, 1960.
- [59] PASSOW H., SCHNELL K. F., Chemical modifiers of passive ion permeability of the erythrocyte membrane, *Experientia*, **25**: 460-468, 1965.
- [60] PASSOW H., WOOD P. G., Current concepts of the mechanism of anion permeability, [w] *Biophysics of membrane transport*, red. Gomulkiwicz J., Tomicki B., Publ. Dept. Agricultural Univ., Wrocław, 1975, 101-124.
- [61] PEARSE A. G., *Histochemistry*, Churchill J. A., Ltd. Londyn 1961, 517.
- [62] PHILLIPS D. R., Effect of trypsin on the exposed polypeptides and glycoproteins in the human platelet membrane, *Biochemistry*, **11**: 4582-4588, 1972.
- [63] PHILLIPS D. R., MORRISON M., The arrangement of proteins in the human erythrocyte membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**: 284-289, 1970.
- [64] — Exterior proteins on the human erythrocyte membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 1103-1108, 1971.

- [65] — Exposed protein on the intact human erythrocyte, *Biochemistry*, **10**: 1766–1771, 1971.
- [66] — Position of glycoprotein polypeptide chain in the human erythrocyte membrane, *FEBS - Letters*, **18**: 95–97, 1971.
- [67] — Changes in the accessibility of plasma membrane protein as the result of tryptic hydrolysis, *Nature New Biol.*, **242**: 213–215, 1973.
- [68] PODUSLO J. F., GREENBERG C. S., GLICK M. C., Proteins exposed on the surface of mammalian membranes, *Biochemistry*, **11**: 2616–2621, 1972.
- [69] POENSGEN J., PASSOW H., Action of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene on passive ion permeability of the human red blood cell, *J. Membr. Biol.*, **6**: 210–232, 1971.
- [70] RADIN N. S., HOF L., BRADLEY R. M., BRADY R. O., Lactosylceramide galactosidase: comparison with other sphingolipid hydrolases in developing rat brain, *Brain Res.*, **14**: 497–505, 1969.
- [71] REICHSTEIN E., BLOSTEIN R., Asymmetric iodination of the human erythrocyte membrane, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **56**: 494–500, 1973.
- [72] RIFKIN D. B., COMPANS R. W., REICH E. A., A specific labeling procedure for proteins on the outer surface of membranes, *J. Biol. Chem.*, **247**: 6432–6437, 1972.
- [73] SCHENKEL - BRUNNER H., TUPPY H., Enzymatic conversion of human O into A erythrocytes and of B into AB erythrocytes, *Nature*, **223**: 1272–1273, 1969.
- [74] SCHMIDT - ULLRICH R., FERBER E., KNUFERMANN H., FISCHER H., WALLACH, D.F.H., Analysis of the proteins in thymocyte plasma membrane and smooth endoplasmic reticulum by sodium dodecylsulfate - gel electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta*, **332**: 175–191, 1974.
- [75] SCHMIDT - ULLRICH R., KNUFERMANN H., WALLACH D. F. H., The reaction of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride (DANSCL) with erythrocyte membranes. A new look at „vectorial” membrane probes. *Biochim. Biophys. Acta*, **307**: 353–365, 1973.
- [76] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720–731, 1972.
- [77] STECK T. L., The organisation of proteins in human erythrocyte membranes, [w] *Membrane Research*, red. Fox, C. F., Acad. Press, N.Y., 1972, 71.
- [78] STECK T. L., DAWSON G., Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.*, **249**: 2135–2142, 1974.
- [79] STONE K. R., SMITH, R. E., JOKLIK W. K., Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblasts and NRK - cells are transformed with avian sarcoma viruses, *Virology*, **58**: 86–100, 1974.
- [80] STRAUSS R. R., PAUL B. B., SELVARAJ R. J., SBARRA A. J., A peroxidase inhibitor in leukemia AKR mouse spleen cells, *Cancer Res.*, **34**: 3220–3224, 1974.
- [81] STRUM J. M., EDELMAN J. S., Iodination (<sup>125</sup>I) of the apical plasma membrane of toad bladder epithelium: Electron-microscopic autoradiography and physiological effects, *J. Membrane Biol.*, **14**: 17–32, 1973.
- [82] SUTHERLAND R. M., ROTHSTEIN A., WEED R. J., Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability, *J. Cell Physiol.*, **69**: 185–198, 1967.
- [83] SUZUKI Y., SUZUKI K., Specific radioactive labeling of terminal N - ace-

- tylgalactosamine of glycosphingolipids by the galactose - oxidase - sodium borohydride method, *J. Lipid Res.*, **13**: 687-690, 1972.
- [84] TARONE G., PRAT M., COMOGLIO P. M., Affinity chromatography purification of erythrocyte membrane proteins after selective labeling with trinitrobenzene sodium sulfonate, *Biochim. Biophys. Acta*, **311**: 214-221, 1973.
- [85] TROWBRIDGE I. S., RALPH P., BEVAN M. J., Differences in the surface proteins of mouse B and T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **72**: 157-161, 1975.
- [86] TSAI C. M., CHEN K., CANELLAKIS E. S., Isolation and characterisation of the plasma membrane of L 1210 cells. Iodination as a marker for the plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **401**: 196-212, 1975.
- [87] TSAI C. M., HUANG C. C., CANELLAKIS E. S., Iodination of cell membrane. I. Optimal conditions for the iodination of exposed membrane components, *Biochim. Biophys. Acta*, **332**: 47-58, 1973.
- [88] VITETTA E. S., BAUR S., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. II. Isolation and characterisation of immunoglobulin from mouse splenic lymphocytes, *J. Exper. Med.*, **134**: 242-264, 1971.
- [89] VITETTA E. S., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. V. Release from murine splenic lymphocytes, *J. Exper. Med.*, **136**: 676-696, 1972.
- [90] WEBER K., OSBORNE M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406-4412, 1969.
- [91] WHITELEY N. M., BERG H. C., Amidination of the outer and inner surfaces of the human erythrocyte membrane, *J. Molec. Biol.*, **87**: 541-561, 1974.
- [92] WIZEMANN V., SCHULZ J., SIMON B., SH-groups on the surface of pancreatic cells involved in secretion stimulation and glucose - mediated secretion, *Biochim. Biophys. Acta*, **307**: 366-371, 1973.
- [92a] ZGLICZYŃSKI J., STELMASZYŃSKA T., Chlorinating activity of human phagocytosing leucocytes, *Eur. J. Biochem.*, **56**: 157-162, 1975.
- [93] ZUBRZYCKA E., Solubilizacja i rekonstytucja błon biologicznych, *Postępy Biologii Komórki*, **2**: 233-248, 1975.

*Otrzymano: 3 marca 1976.*

*Przyjęto: 20 marca 1976.*

*Adres autora: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.*

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron. Maszynopis powinien być jednostronny, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz numeracją stron. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony). Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, rys. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, **73**: 41-48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 60-64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać objaśnienia lub uwagę „objaśnienia w tekście”. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów nie wpływających na treść pracy.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są wg ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 odbitek artykułu bezpłatnie.

Zamówienie na egzemplarze POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI przyjmuje ORWN PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki.

## Warunki prenumeraty kwartalnika

### POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.—      półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa - Książka - Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa - Książka - Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa - Książka - Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona - Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona - Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

**SPIS TREŚCI**

E. BARTKOWIAK, Nowe kierunki w hodowli tkanek i komórek roślinnych in vitro . . . . .	161
J. ROTH, Lectins as molecular probes in morphological investigations on architecture and dynamics of cell surface . . . . .	235
J. KAWIAK, Metody znakowania powierzchni komórek	265