

ALICJA SZWEYKOWSKA

## Z ZAGADNIENÍ MORFOGENEZY U ROŚLIN NOWSZE WYNIKI BADAŃ METODĄ HODOWLI *IN VITRO*

Morfogeneza jest terenem, na którym spotykają się morfologia, genetyka i fizjologia roślin. Ogromny rozwój fizjologii roślin w ostatnich dziesięcioleciach, w tym wybitne osiągnięcia fizjologii wzrostu i rozwoju, nauka o substancjach wzrostowych itp., były jednym z czynników, który pobudził na nowo zainteresowanie dla wyda-  
wałoby się już zapomnianych badań w dziedzinie morfologii doświadczalnej.

Dodatkowym i bardzo istotnym czynnikiem stymulującym było opracowanie nowych metod badań, z których na jednym z pierwszych miejsc należy postawić metodę hodowli *in vitro*. Rośliny stanowią szczególnie dogodny obiekt do badań za pomocą tej metody. Technika hodowli w porównaniu np. z tkankami zwierzęcymi jest stosunkowo prosta, udaje się hodowla w warunkach izolacji zarówno zarodków, jak i wszystkich organów oraz niezróżnicowanych tkanek.

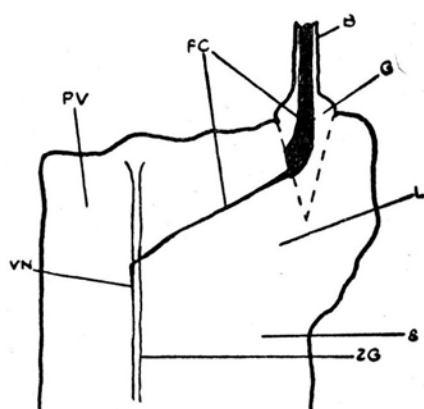
Ogólnie znana jest wielka zdolność regeneracyjna roślin. Metoda hodowli *in vitro* potrafiła doprowadzić tę zdolność do niezwykle wysokiego stopnia. Ballowi (1946) udało się u *Tropaeolum majus* i u *Lupinus albus* zregenerować całe rośliny z kawałków wierzchołka wzrostu pędu objętości 0,06 mm<sup>3</sup> (sześciiany o boku około 0,4 mm) umieszczonych na odpowiedniej pożywce. Wierzchołki wzrostu paproci, które zakorzeniają się jeszcze łatwiej, regenerują całe rośliny z kawałków o wymiarach 0,25 mm, a nawet z kawałków grubości jednej komórki. Stożek wzrostu w hodowli *in vitro* wykazał więc ogromne zdolności regeneracyjne i organizacyjne.

Inaczej ma się sprawa, gdy regenerujący fragment wzięty jest z jakiegokolwiek innej części rośliny poza wierzchołkiem wzrostu. Fragment wyszczepiony w sterylnych warunkach na odpowiednią pożywkę rośnie, wzrost jest jednak nie skoordynowany i w jego wyniku otrzymujemy tzw. kallus, niezorganizowaną morfologicznie i histologicznie, bezkształtną masę tkanki. W dalszych przeszczepieniach w hodowli *in vitro* tkanka kallusowa najczęściej zachowuje swój niezorganizowany charakter i składa się z bezkształtnej masy parenchymatycznej, jednorodnej (typ rzadszy) lub z nieregularnie porzrzuconymi w niej elementami drewna i łyka, mniej lub więcej wykształconymi. Tego rodzaju kulturę Gautheret nazywa «kolonią tkankową», autorzy amerykańscy «tkanką kallusową».

Doświadczenia Camusa (1949) z eksplantatami korzenia endywii (*Cichorium endivia*), a ostatnio bardzo interesujące doświadczenia Wetmore'a i Sorokina (1955) z kulturą tkankową lilaka pozwoliły na zrozumienie organizującej roli

wierzchołka wzrostu pędu i na wyjaśnienie mechanizmu histogenetycznego wpływu stożka wzrostu na niżej leżące tkanki. Camus zaszczepiał pączek endywii na eksplantat (fragment) korzenia tej rośliny i stwierdził, że tkanki łyka w strefie zaszczepienia pączka ulegają odróżnicowaniu w miejscu zrastania się zrazu z podkładką, a następnie różnicuje się w eksplantacie pasmo łyko-drzewne, łączące się ostatecznie z pierwotną wiązką łyko-drzewną (rys. 1). Taki sam pączek zaszczepiony w miejscu, gdzie w eksplantacie przebiega kambium, powoduje wzmózoną działalność tego ostatniego oraz znacznie intensywniejsze aniżeli w kontroli, różnicowanie się elementów przewodzących.

Wetmore i Sorokin przeprowadzili podobne doświadczenia, używając jednak, zamiast fragmentów organów, ustabilizowanej kultury tkankowej lilaka, systematycznie przeszczepianej, na pożywcę zawierającej mleko kokosowe, które działa

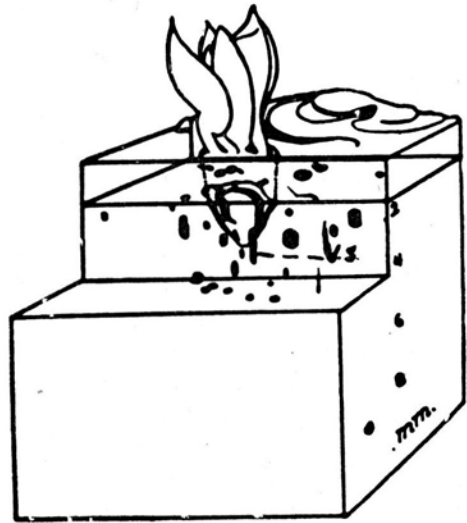


Rys. 1. Histogenetyczne działanie pączka endywii zaszczepionego na fragmencie korzenia. Wyróżnicowanie się pasma łyko-drzewnego w strefie floemu eksplantatu. G — zraz, S — podkładka, B — pączek, FC — utwory sitowo-naczyniowe, L — łyko, ZG — kambium, PV — miękisz drzewny, VN — miejsce połączenia się tkanek przewodzących. Wg Camusa 1949

silnie stymulująco na wzrost tkanki, natomiast przeciwdziała jej różnicowaniu się histologicznemu. W ten sposób Wetmore i Sorokin dysponowali bardzo jednorodną kulturą tkanki parenchymatycznej produkującą rzadko nieliczne elementy drewna. Zaszczepiony na tej tkance pączek rozwijał się szybko w ulistniony pęd. Przekroje podłużne wykonane po kilku tygodniach przez rozwijający się pączek i tkankę służącą mu za podkładkę wykazały duże zmiany anatomiczne, polegające na wyróżnicowaniu się zarówno w podstawie pączka, jak i w jednorodnej ustabilizowanej tkance licznych elementów drewna. Wyróżnicowane gniazda ksylemu miały kształt wydłużony w kierunku prostopadłym do powierzchni pożywki (rys. 2). Wetmore i Sorokin wykonali dalsze doświadczenia w celu określenia zawartego w pączku czynnika histogenetycznego. Okazało się, że jeżeli w nacięciu tkanki zamiast pączka umieścić roztwór wodny agaru zawierający auksynę (kwas  $\beta$ -indoliloctowy) i cukier (sacharoza lub glukoza), otrzymamy ten sam efekt indukowania tkanki przewodzącej w kulturze tkankowej, a także układanie się elementów tej tkanki w sposób podobny jak w łodydze. Przy małej koncentracji auksyny, na poprzecznym przekroju przez kulturę (za przekrój poprzeczny uważamy tu przekrój w płaszczyźnie równoległej do powierzchni pożywki, a prostopadłej do kie-

runku działania auksyny i cukru) otrzymujemy pasma przewodzące ułożone w postaci małego pierścienia. Przy koncentracji wyższej pierścień staje się większy, a pasma są ułożone w większych odstępach od siebie. W pewnych przypadkach pasma przewodzące zostają połączone pierścieniem kambium wiązkowego i międzywiązkowego. Co więcej, w każdym paśmie przewodzącym występuje drewno w części dośrodkowej i łyko w części odśrodkowej. Otrzymujemy obraz podobny do przekroju poprzecznego przez łodygę lilaka: pierścień wiązek łyko-drzewnych otaczający coś w rodzaju parenchymatycznego rdzenia, na zewnątrz pierścienia wiązek również tkanka parenchymatyczna stanowiąca coś w rodzaju kory pierwotnej.

Rys. 2. Histogenetyczne działanie pączka lilaka zaszczipionego na kulturze tkankowej tej rośliny. Wyróżnicowanie się pod wpływem pączka pasm ksylemu w jednorodnej przedtem, parenchymatycznej tkance.  
Wg Wetmore'a i Sorokina 1955



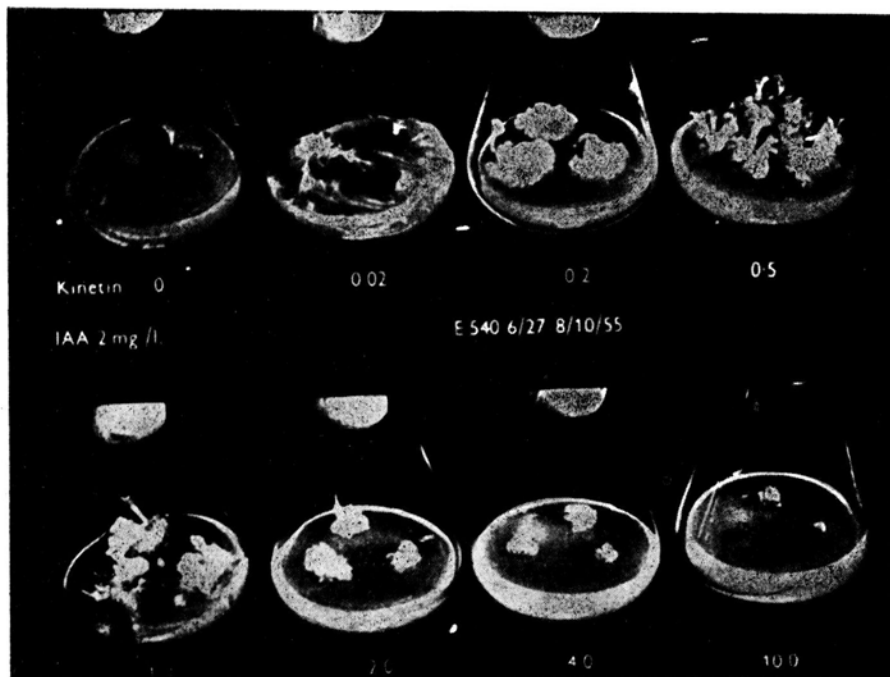
Z doświadczeń Wetmore'a i Sorokina wynikało ponadto, że indukcja floemu wymagała silniejszego stężenia cukru aniżeli indukcja ksylemu. Z punktu widzenia biosyntezy elementów strukturalnych wynik ten był dość nieoczekiwany, gdyż wydawałoby się, że właśnie elementy ksylemu, odznaczające się posiadaniem silnie wykształconych wtórnych błon celulozowo-ligninowych powinny wymagać do swego wyróżnicowania się większej ilości materiału budulcowego, jakim są cukry. Od strony biochemicznej, sprawa roli cukru i auksyn nie jest jeszcze jasna i stanowi prawdopodobnie dość skomplikowany problem (Wetmore 1959).

Opisane wyżej doświadczenia dotyczyły wprowadzenia do nieodróżnicowanej tkanki organizacji histologicznej pod wpływem pączka lub też czynników, które są odpowiedzialne za histogenetyczną aktywność pączka. Oddzielnym problemem jest możliwość organogenezy w kulturach tkankowych. Zdolność różnicowania organów — korzeni i pączków, jest niejednakowa w kulturach tkankowych różnych gatunków i odmian roślin. Kultury tkankowe pewnych roślin są zupełnie pozbawione tej zdolności, u innych różnicowanie, zwłaszcza pączków, jest rzeczą bardzo rzadką, u niektórych dość łatwo spontanicznie różnicują się korzenie i pączki.

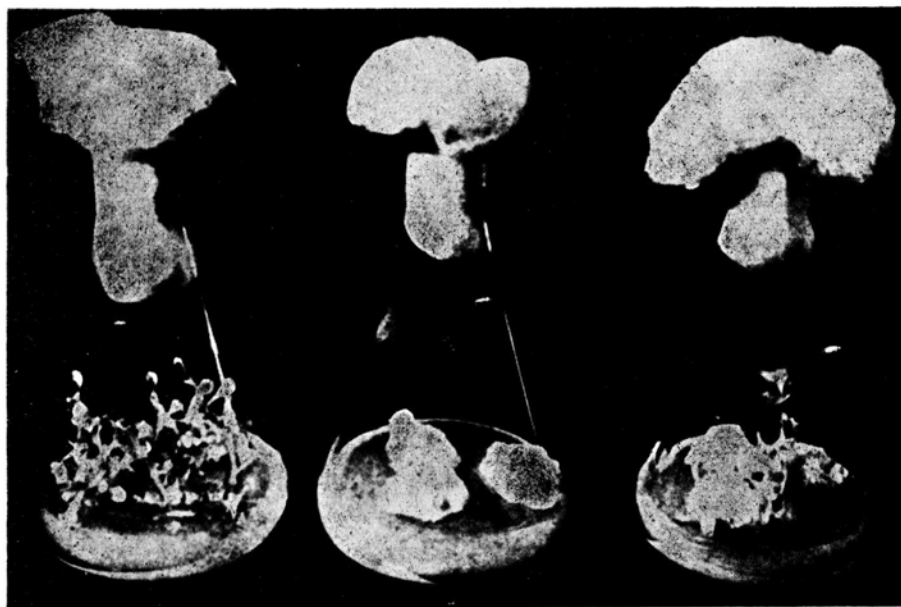
Doświadczenia na kulturach tkankowych potwierdziły znane już przedtem właściwości auksyn indukowania rizogenezy oraz właściwości hamowania rozwoju pączków. Przy okazji doświadczeń nad stymulacją i hamowaniem różnicowania się pączków w kulturach tkanki tytoniu, Skoog i Miller odkryli nową grupę czynników wzrostowych — kininy (wśród nich najaktywniejszą — kinetynę) oraz wykazali ich wybitny udział w różnicowaniu się pączków pędowych w kulturach tkankowych. Badania Skooga i jego współpracowników (1951—56) nad fragmentami pędów i kallusową tkanką tytoniu w hodowli *in vitro* wykazały, że kinetyna jest niezbędnym czynnikiem aktywnej syntezy kwasu dezoksyrybonukleinowego i podziałów komórkowych, a typ wzrostu tkanek i różnicowania się w nich organów zależy od subtelnej ilościowej równowagi pomiędzy kwasem  $\beta$ -indoliloctowym a kinetyną. W tej interesującej grze pomiędzy auksynami a kininami auksyna stymuluje tworzenie się w kulturach korzeni, a hamuje powstawanie pączków, kinetyna zaś, w stosowanym zakresie stężeń, działa hamująco na rizogenezę i silnie stymulująco na różnicowanie się pączków (rys. 3). Nie jest to przy tym działanie antagonistyczne, lecz raczej współdziałanie obu substancji w determinowaniu określonego typu wzrostu. Na fot. 3 pokazany jest wpływ wzrastających stężeń kinetyny na kultury tkankowe tytoniu rosnące na zmodyfikowanej pożywce White'a, zawierającej stałą ilość kwasu  $\beta$ -indoliloctowego, wynoszącą 2 mg/l. W kontrolach następuje pewien wzrost tkanki, polegający głównie na powiększeniu się objętości komórek, oraz wytworzenie się pewnej liczby korzonków. Kinetyna w stężeniu 0,02 mg/ powoduje głównie zwiększony wzrost nie zróżnicowanej tkanki kallusowej, zaś wpływ stężenia 0,5 i 1,0 mg/l polega głównie na formowaniu się i rozwoju pączków oraz przytłumieniu procesu korzeniotwórczego. Jeszcze wyższe stężenia kinetyny mają tendencję do hamowania wzrostu, lecz nie są toksyczne, przeciwnie — kultury hodowane na wysokich stężeniach kinetyny pozostają żywe o całe miesiące dłużej niż kontrolne.

Również fosforany (rys. 4) i aminokwasy (hydrolizat kazeiny, tyrozyna — rys. 5) mogą mieć istotny wpływ na typ wzrostu i różnicowanie się organów w kulturze tkanki kallusowej.

Na podstawie tych doświadczeń Skoog i Miller (1957) wypowiadają się przeciwko teorii specyficznych organotwórczych substancji. Regulowanie wzrostu i różnicowanie się jest ich zdaniem raczej powodowane przez ilościowe współdziałanie bardzo wielu niespecyficznych czynników wzrostowych aniżeli przez działanie specyficzne tych czynników. W świecie roślinnym panuje jednorodność co do wymagań czynników wzrostowych i ten sam w zasadzie mechanizm reguluje wszystkie typy wzrostu. Trzeba zaznaczyć, że poglądy Skooga nie są powszechnie podzielane (Bouilenne, Morel, Gautheret 1957). Gautheret podkreśla fakt, że istnieje wiele tkanek, w których żadną kombinacją znanych czynników wzrostowych nie udało się dotąd wywołać procesu różnicowania się korzeni czy pączków, tak jak to miało miejsce w tkance tytoniu Skooga. W każdym razie, badania Skooga stanowią skuteczne zaatakowanie węzłowego problemu organogenezy, z pomocą i dzięki hodowli *in vitro*.



Rys. 3. Wpływ kinetyny na wzrost i organogenezę w kulturze tkankowej tytoniu, na pożywce z kwasem  $\beta$ -indoliloctowym. Wg Skooga i Millera 1957



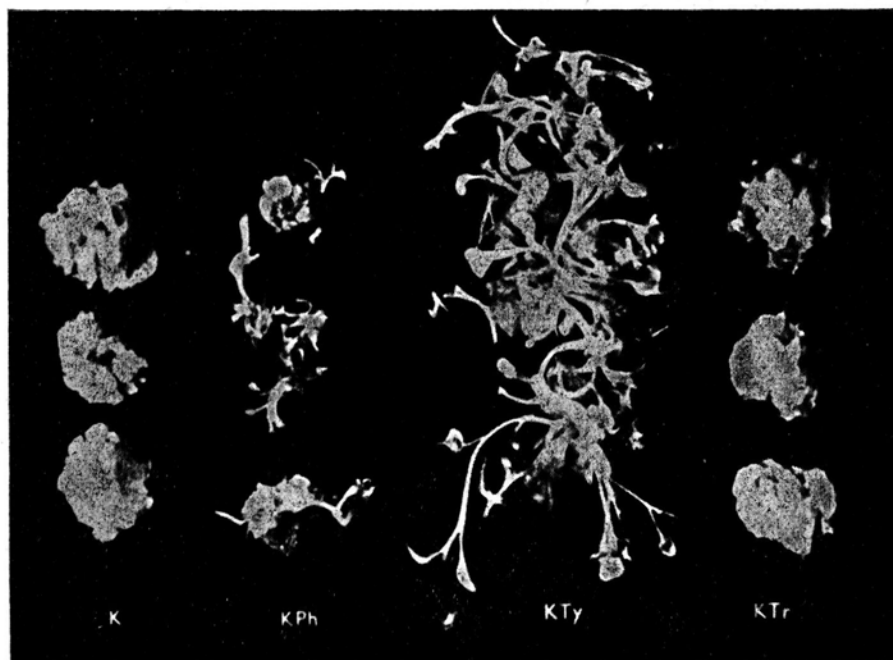
Rys. 4. Tworzenie się pączków w kulturze tkankowej tytoniu na pożywce: *A* — z kinetyną 0,2 mg/l, *B* — z kinetyną 0,2 mg/l i kwasem  $\beta$ -indoliloctowym 2 mg/l, *C* — z kinetyną 0,2 mg/l, kwasem  $\beta$ -indoliloctowym 2 mg/l i z dodatkiem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  400 mg/l. Wg Skooga i Millera 1957

Wróćmy raz jeszcze do niezwykłych zdolności roślin do wegetatywnego rozmnażania. Badania z zastosowaniem hodowli *in vitro* wykazały, że regeneracja całej rośliny może nastąpić zarówno z mikroskopijnie małych fragmentów wierzchołka wzrostu, jak i z niezróżnicowanej kultury tkankowej. Nasuwa się w związku z tym zagadnienie, jak daleko pod względem zdolności do pełnej regeneracji idą potencje pojedynczej wegetatywnej komórki.

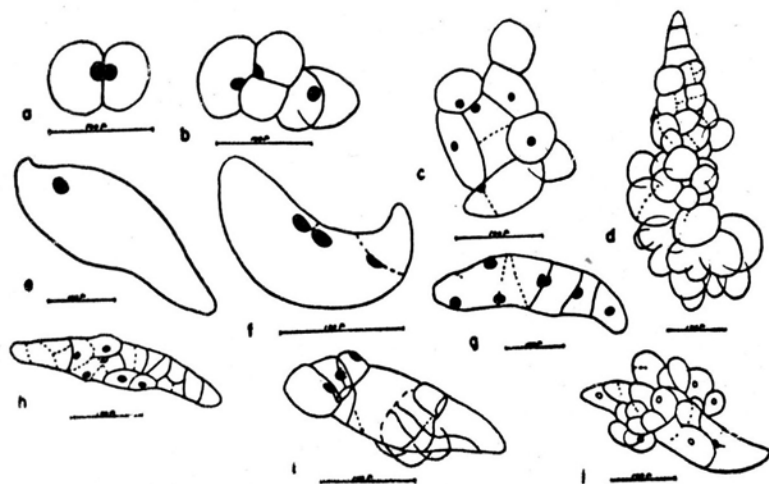
Szczególne znaczenie dla tej kwestii mają prace prowadzone w latach ostatnich (1958—60) przez Stewarda. Steward hodował fragmenty łyka korzeni marchwi na płynnej pożywce zawierającej 10% mleka kokosowego. Kultury nie były stale zanurzone w pożywce, lecz umieszczone na wolno obracającym się kole (hodowle obrotowe), co pozwalało kulturom periodycznie zanurzać i wynurzać się z pożywki. Eksplantaty wytworzyły normalny kallus, prócz tego płynna pożywka uległa zmętnieniu. Mikroskopowe badanie pożywki pozwoliło stwierdzić obecność w niej żywych komórek marchwi, pojedynczych i w małych grupach. Było oczywiste, że komórki te pochodzą z rosnącego eksplantatu, z tzw. pseudoplech — sznurów komórek lub pojedynczych komórek wyrastających często z powierzchni eksplantatów. Dalsze obserwacje komórkowych kultur dały bardzo interesujące rezultaty. Pojedyncze komórki dzieliły się, i to w najróżniejszy sposób. Jedne dzieliły się wielokrotnie na jednakowe komórki potomne, dając w wyniku kolonie izodiametrycznych komórek. Inne powiększały wielokrotnie swą objętość, do rozmiarów 300—400 $\mu$ , przy czym były to przeważnie komórki wielojądrowe, w których później często następowały podziały cytokinetyczne, tak że ostatecznie otrzymywano grupę małych komórek zamkniętą w dużej wyjściowej błonie komórkowej (rys. 6). Inne komórki dzieliły się, dając wielokomórkowe nitki z poprzecznymi błonami komórkowymi, jeszcze inne pączkowały jak komórki drożdży.

Jakikolwiek był sposób rozmnażania się komórek, doprowadzał on w końcu do powstania wielokomórkowych agregatów o nieregularnym kształcie. Dalszy rozwój agregatów następował według jednolitego schematu. W nieregularnej, trójwymiarowej masie komórek różnicowała się wkrótce centralna grupa w sposób charakterystyczny dla rozwijających się elementów przewodzących (ksylemu i trudniejszego do zidentyfikowania floemu). Na zewnątrz gniazda ksylemu pojawiała się grupa komórek dzielących się regularnie, przeważnie w płaszczyźnie stycznej do gniazda komórek drewna, tworząc coś w rodzaju warstwy kambialnej. Różnicowanie się tej centralnej grupy komórek następowało wyłącznie po osiągnięciu przez komórkowy agregat pewnych minimalnych rozmiarów, co świadczyłoby o tym, że impuls do różnicowania się był uzależniony od zaistnienia pewnego wewnętrznego środowiska dla centralnie umieszczonych komórek.

Na tym nie kończą się jednak możliwości rozwojowe agregatów pochodzących z pojedynczej komórki. Jeszcze na płynnej pożywce możliwe jest powstanie w nich zawiązków korzeni, jednakże dopiero przeniesienie kultur w tym stadium do zwykłych stacjonarnych probówek ze stałą pożywką agarową daje im możliwość dalszego różnicowania się. Następuje rozwój zawiązków korzeni i powstanie nowych. Wkrótce po korzeniach zaczyna się różnicować oś pędu w kierunku przeciwnym

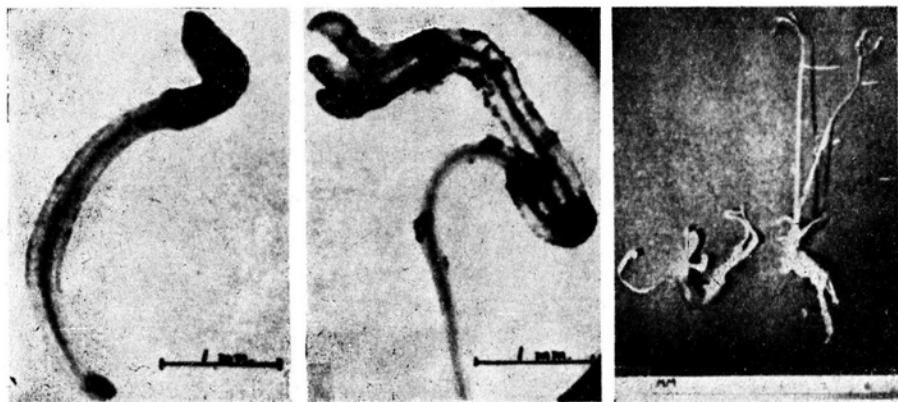


Rys. 5. Wpływ aminokwasów na wzrost i organogenezę w kulturach tkankowych tytoniu na pożywce z kwasem  $\beta$ -inuliooctowym 2 mg/l, kinetyną 0,2 mg/l i z dodatkiem: *K* — żadnym, *KPh* — fenyloalaniny, *KTy* — tyrozyny, *KTr* — tryptofanu. Wg Skooga i Millera 1957



Rys. 6. Rozwój wolnych komórek marchwi zawieszonych w płynnej pożywce. Przejście od wolnych izodiametrycznych komórek do trójwymiarowych agregatów komórkowych (*a—d*) oraz od wielojądrowych komórek olbrzymich do agregatów komórkowych (*e—j*). Wg Stewarda, Mapesa i Smitha 1958

do osi korzenia. Zawiązek pędu posiada dzięki elementom przewodzącym bezpośrednie połączenie z centralnym gniazdem wyróżnicowanych komórek przewodzących, a poprzez nie — z korzeniem. Na osi pędu w regularny sposób różnicują się zawiązki liści. Powstały w ten sposób «zarodek» roślinny kontynuuje swój wzrost i rozwój i przekształca się w roślinę marchwi z wszystkimi jej charakterystycznymi cechami (rys. 7—10).



Rys. 7—9. Rozwój młodych roślinek marchwi pochodzących od pojedynczych agregatów komórkowych.  
Wg Stewarda 1958



Rys. 10. Młoda roślina marchwi powstała w wyniku rozwoju pojedynczej wolnej komórki vegetatywnej, rosnąca na agarowej pożywce z dodatkiem mleka kokosowego. Wg Mitry, Mapesa i Stewarda 1960

Ważne wnioski wynikają z doświadczeń Stewarda. Okazuje się, że wolna parenchymatyczna komórka obdarzona jest totipotencją rozwojową. Pewne fazy rozwoju takiej komórki przypominają rozwój zapłodnionej komórki jajowej, np. nitkowaty układ komórek w pierwszym stadium rozwoju zarodka okrytozależko-



wych, wielojądrowe stadium w pierwszym okresie rozwoju zarodka nagonasien-nych, pod niektórymi względami przypominają też pewne stadia rozwoju zarodków paproci, widlaków, skrzypów lub młodych pączków różnicujących się w kallusie tytoniu (Sterling 1950). Ciekawym momentem jest również niezbędność mleka kokosowego lub innego odpowiedniego płynnego bielma w środowisku rozwijających się komórek. Stanowi to dalsze podobieństwo do zarodków rozwijających się w naturalnych warunkach w macierzystym organizmie.

W konsekwencji wydaje się, że biochemiczne problemy związane z wytworzeniem roślinnego organizmu są te same, niezależnie od tego, czy rozwój następuje z zapłodnionego jaja, czy z wolnej wegetatywnej komórki, czy też z embrionalnego pączka. Pierwsze fazy rozwojowe zarodków nie wydają się być ściśle określone. Dopiero po osiągnięciu przez zarodek — niezależnie od jego pochodzenia — stadium trójwymiarowego agregatu komórek, dalszy rozwój następuje w sposób określony ściślej. W rozwoju tym dają się wyróżnić pewne węzłowe punkty, fazy, jak np. bezkształtny agregat komórek, wyróżnicowanie się w jego centrum tkanki przewodzącej, wytworzenie korzonka, wytworzenie pędu i zawiązków liści. Jakie czynniki biofizyczne i biochemiczne określają przechodzenie z jednej fazy do drugiej — pozostaje na razie kwestią otwartą.

Powyższy krótki przegląd daje obraz osiągnięć w dziedzinie poznania mechanizmów morfogenetycznych u roślin, jakie były możliwe do uzyskania dzięki metodzie hodowli *in vitro*. Podstawową cechą metody są szerokie możliwości ścisłego kontrolowania warunków nie tylko zewnętrznych, ale i wewnętrznych rozwoju rośliny, nie tylko rośliny jako całości, ale i jej organów, fragmentów organów, tkanek, a nawet komórek. Te możliwości polegają na aseptyczności kultury, co pozwala stosować dowolnie szeroki wachlarz substancji nieorganicznych i organicznych, odżywczych i stymulujących. Przy hodowli organów, tkanek i komórek jesteśmy w stanie wyeliminować czynniki korelacji i poznać następnie ich charakter przez zastępowanie ich znanymi czynnikami fizykalnymi i chemicznymi. Możliwości metody dalekie są jeszcze od wyczerpania i możemy spodziewać się z jej pomocą dalszych sukcesów w dziedzinie poznania procesów morfogenetycznych w roślinach.

#### LITERATURA

1. Ball E., 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. Amer. Jour. Bot., 33, 301—318.
2. Camus G., 1949. Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. Rev. Cvtol. Biol. Vég., 11, 1—195.
3. Gautheret R. J., 1957. Histogenesis in plant tissue cultures. Jour. National Cancer Inst., 19, 555—590.
4. Gautheret R. J., 1959. La culture des tissus végétaux, 863 pp. Paris, Masson et C<sup>ie</sup>.
5. Mitra J., Mapes M. O. and Steward F. C., 1960. Growth and organized development of cultured cells. IV. The behavior of the nucleus. Amer. Jour. Bot., 47, 357—368.

6. Skoog F. and Miller C. O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., No. XI. The biological action of growth substances, 118—131.
7. Sterling C., 1950. Histogenesis in tobacco stem segments cultured *in vitro*. Amer. Jour. Bot., 37, 464—470.
8. Steward F. C., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Interpretation of the growth from free cell to carrot plant. Amer. Jour. Bot., 45, 709—713.
9. Steward F. C., Mapes M. and Smith J., 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Amer. Jour. Bot., 45, 693—703.
10. Wetmore R. H., 1959. Morphogenesis in plants — a new approach. Amer. Scientist, 47, 326—340.
11. Wetmore R. H. and Sorokin S., 1955. On the differentiation of xylem. Jour. Arbor., 36, 305—317.