

M. ZENKTELER, I. GUZOWSKA

O NIEKTÓRYCH ZAGADNIENIACH EKSPERYMENTALNEJ EMBRIOLOGII ROŚLIN

Część I. Poliembrionia

WSTĘP

Embriologia eksperymentalna jest nową dziedziną w botanice, która wyodrębniła się w latach ostatnich głównie dzięki zastosowaniu metody hodowli *in vitro*. Do pierwszych prac z embriologii eksperymentalnej można zaliczyć badania Gärtnera (1849), Massarta (1902) i Fittinga (1909) dotyczące pęcznienia zalążni pod wpływem spor *Lycopodium*, nieżywotnych pollinii oraz ekstraktów pyłkowych. W latach późniejszych zaczęto przeprowadzać zakrojone już na szeroką skalę doświadczenia nad hodowlą zarodków w warunkach sztucznych na pożywkach. Hodowla zarodków jest kierunkiem embriologii eksperymentalnej, który może poszczycić się stosunkowo największymi osiągnięciami zarówno w dziedzinie zagadnień ściśle teoretycznych, jak również w przypadkach prac hodowlanych. Dzięki opracowanej metodzie hodowli zarodków na pożywkach, można było między innymi: a) hodować zarodki takich mieszańców, które w naturze nie rozwijały się; b) pominąć okres spoczynku nasienia i tym samym skrócić czas rozwoju rośliny aż do osiągnięcia dojrzałości; c) sprawdzić w krótkim okresie czasu siłę żywotną nasion.

U roślin kwiatowych mało wiemy do tej pory na temat czynników odpowiedzialnych za rozwój pylnika, zalążni, załączka, bielma oraz o procesach biochemicznych zachodzących w nich podczas rozwoju. Z tych względów metoda hodowli *in vitro* jest coraz powszechniej stosowana w doświadczeniach takich jak sztuczne zapylanie i zapładnianie, hodowla załączków i zalążni, indukowana partenokarpia, hodowla bielma dojrzałego i niedojrzałego, hodowla owoców w różnych stadiach rozwoju.

W literaturze polskiej i obcej ukazało się sporo prac i artykułów przeglądowych dotyczących hodowli zarodków, owoców, przechowywania i hodowli ziarn pyłko-

wych (Czajkowska 1956, Johri i Vasil 1961, Nitsch 1963, Narayanaswami i Norstog 1964, Jaranowski 1965, Joffe i Żhukowa 1965, Raghavan 1966), natomiast mało lub zupełnie brak jest publikacji poświęconych takim zagadnieniom jak indukowana poliembrionia oraz zapładnianie załączków i zapylenie słupków w warunkach hodowli in vitro. Dlatego w niniejszym oraz następnym artykule zostaną przedstawione powyższe zagadnienia celem zainteresowania nimi polskich botaników i zwrócenia uwagi na możliwości, jakie stawiają one przed współczesną embriologią roślin.

BADANIA NAD INDUKOWANĄ POLIEMBRIONIĄ W WARUNKACH HODOWLI IN VITRO

Na podstawie prac z embriologii opisowej wiadomo, że dodatkowe zarodki u roślin mogą powstawać w różny sposób. Mogą one m. in. rozwijać się z zapłodnionych komórek jajowych kilku woreczków załączkowych rosnących jeden przy drugim np. w rodzinie *Loranthaceae*; z niezapłodnionej synergidy, np. u *Argemone mexicana*; z zapłodnionej synergidy, np. u *Sagittaria graminea*; z rozszczepienia zygotycznego zarodka np. u *Eulophia epidendra*; z proliferacji suspensora np. u *Dipteracanthus patulus*; z haploidalnej komórki antypody np. u *Zeuxine sulcata*; z komórek nucellusa np. u *Mangifera indica*; z wewnętrznej warstwy integumentu wewnętrzznego np. u *Spiranthes cernua* (Maheshwari i Sachar 1963).

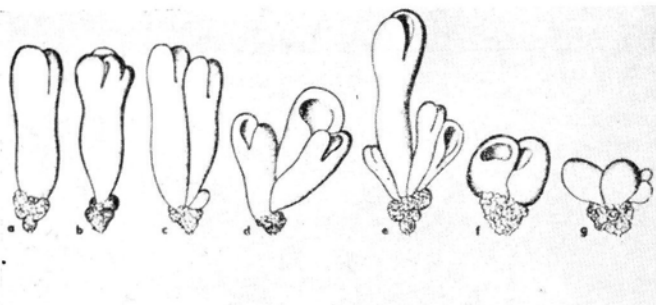
W ostatnich latach wykonano szereg prac doświadczalnych, w których w oparciu o zastosowanie udoskonalonej techniki izolowania organów i tkanek oraz ich hodowli w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach wykazano, że poliembrionia w warunkach sztucznych może być wywołana nawet w takich organach i tkankach, w jakich w warunkach naturalnych nie zachodzi.

Korzystny materiał do badań nad indukowaniem przybyszowych zarodków stanowią storczyki. Curtis i Nichol (1948) hodowali na pożywkach zarodki *Vanda tricolor* i mieszańce *Cymbidium*. Zarodki wytwarzały kalus, który po przeszczepieniu wykazywał nieograniczony wzrost. Zdarzały się jednak przypadki gdy z kalusa wyrastały normalnie wykształcone rośliny posiadające korzenie, lodygę i liście.

Haccius (1955) przeprowadziła interesujące doświadczenia nad *Eranthis hiemalis*. W roślinie tej nasienie zawiera nieodróżnicowany zarodek, którego liścienie wykształcają się dopiero po kilku miesiącach od czasu wysypania się nasion. Świeże nasiona z nieodróżnicowanymi zarodkami poddawano działaniu 0,1% roztworu kwasu dwuchlorofenoksyoctowego (2,4-D), co spowodowało u wszystkich zarodków duże anormalności w wykształcaniu się liścieni. Obserwowano np. w jednym zarodku dużą liczbę liścieni, jak również ich zrastanie się, a u 3—8% załączków stwierdzono występowanie bliźniaczych zarodków (w materiale kontrolnym tego rodzaju zarodki pojawiały się tylko w 0,3% załączków). W doświadczeniach przeprowadzanych kilka lat później (1965) autorka poddawała nasiona z niedojrzalymi zarodkami działaniu promieni Roentgena. Okazało się, że przy dawkach od 1000—2000 r nie wszystkie komórki zarodka zostały zabite, ale niektóre z nich dalej

dzieliły się tworząc kompleksy merystematycznych komórek (autorka nazywała je embrioidami), z których następnie powstawały zarodki przybyszowe o różnej liczbie liścieni (Rys. 1).

Prazarodki *Cuscuta reflexa* (Maheshwari i Baldev 1962) i *Dendrophthoe falcata* (Johri i Bajaj 1963), hodowane na pożywce mineralnej White'a z dodatkiem mleka kokosowego i substancji wzrostowych, wytwarzały masę kalusową. Kompleksy komórek warstw zewnętrznych kalusa różnicowały się w zarodki, które następnie wyrastały ponad powierzchnię kalusa. Budową morfologiczną przypominały one prawidłowo wykształcone zarodki, jakie spotyka się u tych roślin w warunkach naturalnych.



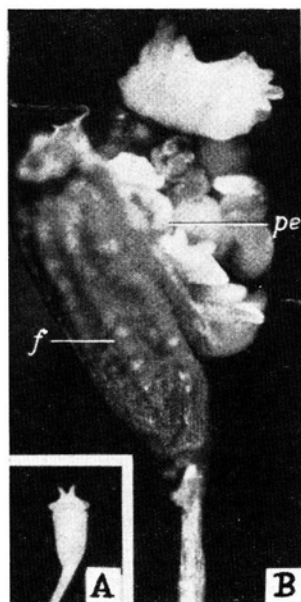
Rys. 1. Zregenerowane zarodki *Eranthis hiemalis*: a — normalny; b — czteroliścieniowy; c — e — wielo-
liścienisty; f — g — zdegenerowany. Wg Haccius 1965

Joshi (1962) hodował zalążki *Gossypium hirsutum* var. *Indore 2* w stadium 12-komórkowych prazarodków, na pożywce mineralnej White'a z dodatkiem ekstraktu z zalążków, hydrolizatu kazeiny i kinetyny. Z prazarodków wyrastała embrionalna masa komórek, która różnicowała się następnie w struktury przypominające pączki, z których jednak nie udało się otrzymać siewek.

Johri i Seghal (1963a, b) wyszczepiali zalążnie *Anethum graveolens* w trzy dni po zapyleniu, tj. w czasie, kiedy w zalążkach występowały zygoty i bielmo jądrowe. Do pożywki mineralnej White'a dodawano w różnych stężeniach hydrolyzatu kazeiny, ekstrakt drożdżowy i kwas β -indoliloctowy. Po 20 tyg. od wyszczepienia zalążni z masy kalusowej 16% kultur wyrastały liczne zarodki (Rys. 2) o liczbie liścieni 2—6. Zarodki te osiągały dojrzałość i po przeniesieniu na świeżą pożywkę wytwarzały prawidłowo wykształcone siewki. Jak wykazały badania anatomiczne, masę kalusową wytwarzały prazarodki, a z niej następnie wyróżnicowały się zarodki. Próbowano izolować również z zalążków pojedyncze prazarodki i hodować je na pożywkach. Nie rozwijały się one jednak i wczesnie zamierały. Zdaniem autorów pracy poliembryonię u *Anethum graveolens* można wywołać tylko wtedy, kiedy hoduje się zalążnie z prazarodkami w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych, tj. w stadium zygoty lub wczesnoglobularnym. Wyniki dalszych doświadczeń zostały opisane w następnej publikacji (Johri i Seghal 1965). Przeszczepiono zalążnie w 3 dni po zapyleniu i otrzymano po 13—14 tygodniach ho-

dowli nasiona, których zarodki kiełkowały dając następnie siewki. Niektóre siewki rosły jednak bardzo wolno, były albinotyczne i taśmowate. Siewki te przeszczepiano na świeże pożywki i po 8—12 miesiącach hodowli taśmowate lodygi różnicowały się w utwory podobne do zarodków, które rozwijały się dalej w plechowate lub przypominające kolonie koralowców rośliny. Tego rodzaju formy roślinne powstałe na drodze rozmnażania wegetatywnego nazwano «neomorphs». Po przeszczepieniu «neomorphs» na świeże zmodyfikowane pożywki otrzymano normalnie wykształcone siewki. W powyższych doświadczeniach, podobnie jak przy indukowaniu zygotycznej poliembrionii, wytwarzanie «neomorphs» może służyć jako metoda dla otrzymania na drodze wegetatywnej siewek o pożądanych cechach.

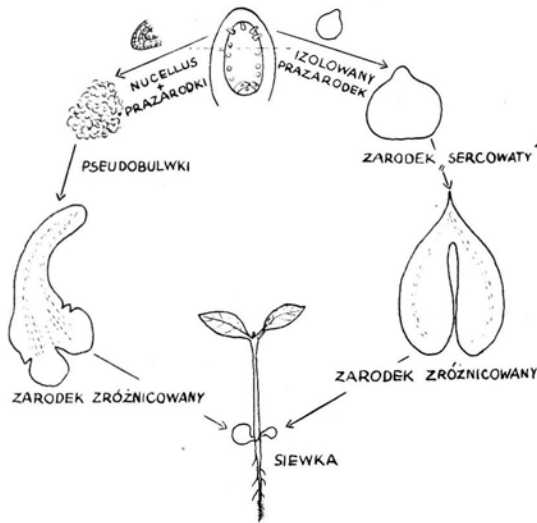
Kilka szczegółowych prac nad indukowaną poliembrionią u *Citrus microcarpa* przeprowadził Rangaswamy (1958, 1959, 1961). Nucellus u *Citrus microcarpa* charakteryzuje się tym, że w warunkach naturalnych rozwijają się w jego obrębie



Rys. 2. Poliembrionia u *Anethum graveolens*: A — zalążnia w dniu wyszczerpienia; B — poliembrionalna masa w pękniętym owocu po 20 tygodniach hodowli; f — owoc; pe — poliembrionalna masa. Wg Johriego i Seghala 1963

przybyszowe prazarodki. Rangaswamy hodował nucellus wraz z tymi prazarodkami oraz oddzielnie wyizolowane z niego nagie prazarodki na pożywce mineralnej Nitscha z dodatkiem hydrolizatu kazeiny. Nucellus z prazarodkami silnie proliferował dając masę tzw. pseudobulwek («pseudobulbils»), które z kolei wytwarzały normalnie siewki. W tych przypadkach, kiedy hodowano same prazarodki, nie wytwarzały one pseudobulwek ale bezpośrednio drogą różnicowania się w dojrzały zarodek dawały siewki (Rys. 3).

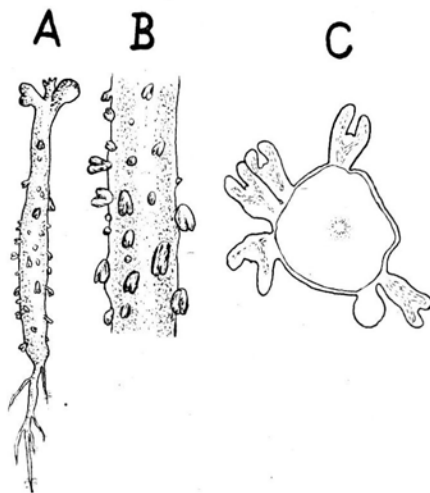
W ostatnich dwóch latach szereg interesujących doświadczeń nad poliembrionią u *Ranunculus sceleratus* przeprowadzili Konar i Nataraja (1964, 1965a, b, c). Autorzy ci wyszczepiali zawiązki pąków kwiatowych na pożywkę mineralną White'a z dodatkiem mleka kokosowego i kwasu β -indoliloctowego. Po dwóch tygodniach hodowli z eksplantatów wyrastał kalus, który wykazywał intensywny wzrost. Po około 25 dniach z kalusa wyrastały korzenie i pędy, a po 10 tygodniach od mo-



Rys. 3. *Citrus microcarpa*. Schemat przedstawiający rozwój siewki z hodowanego nucellusa i prazarodków. Wg Rangswamy 1961

mentu wyszczepienia na szczycie każdej rośliny rozwijał się pąk kwiatowy. U 50% kultur w kalusie znajdowano struktury przypominające zarodki, których rozwój przebiegał podobnie do zarodka zygotycznego. Zarodki te po przeniesieniu na świeżą pożywkę kiełkowały i rozwijały się w normalne rośliny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że z epidermy łodyg tych roślin wyrastały zarodki przybyszowe (Rys. 4). Najpierw pojawiały się one na hypokotylu, a później stopniowo na całej łodydze. Kiedy z kolei zarodki te odcięto i przeniesiono na pożywkę, dawały one znów nowe siewki. Autorzy ci wyszczepiali również pylniki (zawierające 2-komórkowe pyłki) na pożywkę mineralną White'a z dodatkiem mleka kokosowego i 2,4-D. Po 4 tygodniach hodowli tkanka łącznika wytworzyła kruchy kalus, na powierzchni którego wykształcały się po okresie 7—8 tygodni embrioidy, z których następnie w ciągu dalszych 2 tygodni hodowli formowały się zarodki z 2—4 liścieniami. Zarodki otrzymane z pylników po przeniesieniu na świeżą pożywkę kiełkowały dając prawidłowo wykształcone rośliny.

Jednym z nielicznych doniesień na temat indukowanej poliembrionii u roślin nagolażkowych jest praca Konara i Oberoi'a (1965). W warunkach sterylnych z szyszek *Biota orientalis* wyizolowano zarodki w różnych stadiach rozwojowych i przenoszono je na pożywki mineralne White'a z różnymi dodatkami oraz na po-



Rys. 4. Zarodki wyrastające z epidermy łodygi *Ranunculus scellaratus*: A — 1-miesięczna siewka, której łodyga pokryta jest dodatkowymi zarodkami; B — wycinek A w powiększeniu; C — przekrój poprzeczny łodygi z kilkoma rozwijającymi się zarodkami. Wg Konara i Nataraja 1965

żywki stosowane przez Butenko i Jakovlewą (1962). Próby hodowli młodych zarodków w stadiach jeszcze przed wykształceniem się liścieni nie powiodły się, natomiast zarodki, u których zaznaczał się już wzrost liścieni, rozwijały się bardzo szybko na prawie wszystkich stosowanych pożywkach. Już po 3—4 dniach hodowli liścienie dojrzywały i stawały się intensywnie zielone. Na pożywce mineralnej White'a z dodatkiem kwasu β -indoliloctowego i ekstraktu z drożdży w niektórych kulturach hypokotyl wytwarzał kalus, wzrost korzenia i pędu został zainicjowany, jednak dalszy ich rozwój nie następował. Na pożywce Butenko liścienie dojrzywały już po pierwszym tygodniu hodowli. Równocześnie tworzył się krótki czopiasty korzeń, mały kalus na hypokotyli i kilka wyraźnych nabrzmię na liścieniach. Korzeń i pęd nie rosły dalej, a po 8 tygodniach hodowli na wewnętrznej powierzchni liścieni obserwowano 5—7 nabrzmię. Nabrzemia te stopniowo różnicowały się w struktury przypominające zarodki z dwoma liścieniami (Rys. 5). Gdy zarodki te wraz z małą ilością tkanki liścienia odcięto i przeniesiono na świeżą pożywkę, tworzyły one normalne pędy ze spiralnie ułożonymi liśćmi, jakkolwiek nigdy nie wytwarzały korzeni.

Dwa lata wcześniej Vasil (1963) wyszczepiał na pożywki zarodki *Gnetum ula* i po 4 tygodniach hodowli stwierdził, że w tkance kalusowej powstałej z zarodków różnicują się struktury przypominające prazarodki lub pączki. Nie rozwijały się one jednak w zarodki i tym samym nie otrzymano w pełni rozwiniętych roślin. Odmienne więc jak w przypadku *Biota orientalis*, rozwój dodatkowych prazarodków lub zarodków został bardzo wczesnie zahamowany.

Norstog (1963) hodował żeńskie gametofity *Zamia integrifolia* na 13 różnych pożywkach. W większości wypadków z gametofitów wyrastały kalusy, z których następnie wyróżnicowały się liście i korzenie haploidalne. Tylko na jednej z po-

żywek zawierającej między innymi fosforany, glutaminę i alaninę otrzymano kilka embrioidów, zwykle z dwoma liścieniami. Próby pobudzenia embrioidów do dalszego wzrostu i tym samym do otrzymania haploidalnych roślin nie powiodły się.



Rys. 5. Siewka *Biota orientalis* z embrioidami na proliferujących liścieniach. Wg Konara i Oberoia 1965

Poliembrionia została także stwierdzona podczas hodowli dojrzałych pylników *Datura innoxia* (Guha i Maheshwari 1964). Pylniki zawierające dojrzałe pyłki hodowano na pożywkach White'a i Nitscha z następującymi dodatkami w różnych stężeniach i kombinacjach: hydrolizat kazeiny, kwas β -indoliloctowy, kinetyna, mleko kokosowe, sok z winogron i sok ze śliwek. Po 6–7 tygodniach hodowli ze wszystkich stron pylników (w tym okresie były one już ciemnobrązowe i wydawało się, że zamierają) zaczęły wyrastać białe zarodki, przypominające normalne zarodki zygotyczne, z tym tylko, że wiele z nich posiadało więcej niż 2 liścienie. Po przeszczepieniu na świeże pożywki zarodki wyrastały w prawidłowo wykształcone siewki złożone z łodygi, liści i korzeni. Autorzy nie potrafili wyjaśnić źródła pochodzenia tych zarodków, choć wiele danych wskazywało, że jest nim prawdopodobnie łącznik pylnika. W następnej pracy (1966) wykazali oni na podstawie badań histologicznych i cytologicznych, że zarodki dodatkowe powstają z ziarn pyłkowych. Tak zarodki jak i otrzymane z nich siewki miały haploidalną liczbę chromosomów. Jest to pierwsze doniesienie na temat powstania zarodków z pyłków u roślin okrytozalążkowych. W dotychczasowych pracach nad hodowlą dojrzałych pylników na pożywkach tylko u *Ranunculus sceleratus* i *Datura innoxia* udało się stwierdzić poliembrionię.

Do niewielu doświadczeń związanych z hodowlą liści na pożywkach i otrzymaniem z nich dodatkowych zarodków należą prace Haccius (1965) i Kohlenbacha (1965). Haccius hodowała liście *Nicotiana tabacum*. Z otrzymanego kalusa wyróżnicowały się zarodki. Praca Kohlenbacha dotyczy otrzymania zarodków

przybyszowych z liści *Macleya cordata*. Z kalusa powstałego z tkanki palisadowej różnicowały się zarodki przybyszowe.

W doświadczeniach nad indukowaniem poliembrionii nie zawsze wykształca się najpierw prazarodek lub zarodek, z którego następnie rozwija się siewka. Maheshwari, Geeta i Guha (1965) hodowali liście *Nicotiana tabacum* na pożywkę White'a z dodatkiem mleka kokosowego, kwasu β -indoliloctowego i kinetyny. Liście wytwarzały kalus, na powierzchni którego wyrastały liczne struktury przypominające pąki, które przekształcały się w ulistnione łodygi. Przypominały one normalne rośliny tytoniu, z tą jednak różnicą, że nie wytwarzały korzeni.

Ostatnim doniesieniem dotyczącym tworzenia się pąków z masy kalusowej powstałej w wyniku polifracji niedojrzałych zarodków jest praca Zenktelea (1966). Wyszczepiano zalążki *Fagopyrum sagittatum* z niedojrzałymi zarodkami na pożywkę White'a z dodatkiem 2,4-D i ekstraktu drożdżowego. Już pod koniec pierwszego tygodnia hodowli następowało silne kalusowanie zarodka, a po 6 tygodniach z masy kalusowej wyrastały pąki, które po przeszczepieniu na świeżą pożywkę White'a z dodatkiem mleka kokosowego rozwijały się w normalne siewki złożone z łodygi, liści i bogatego systemu korzeniowego (Rys. 6).

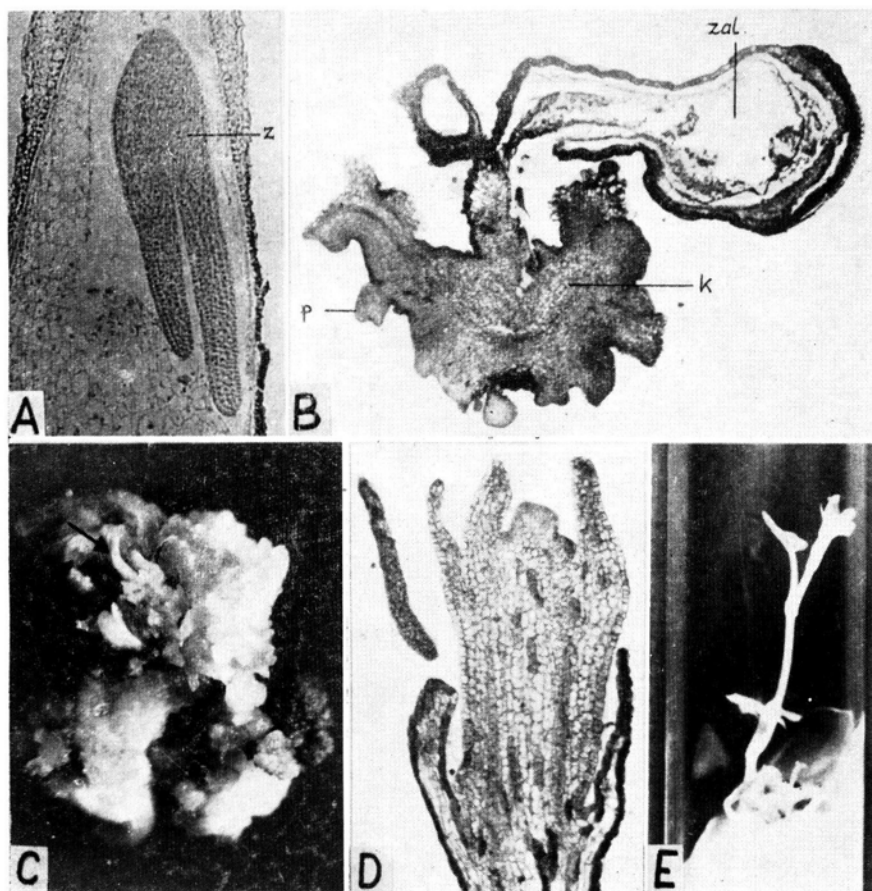
Na marginesie przedstawionego wyżej przeglądu prac, dotyczących przede wszystkim powstawania dodatkowych zarodków z organów kwiatowych, warto wspomnieć o interesujących publikacjach jakie ukazały się w ostatnich ośmiu latach na temat zdolności do regeneracji pojedynczej vegetatywnej komórki. (Steward 1958; Steward, Mapes i Smith 1958; Muir, Hildebrandt i Riker 1958; Reinert 1959; Szweykowska 1961; Riker i Hildebrandt 1962; Wetherell i Halperin 1963; Steward i Mapes 1963; Steward 1963; Halperin i Wetherell 1964; Halperin 1964; Earle i Torrey 1965; Vasil 1965).

Wykazanie totipotencji komórek roślinnych stanowi jedno z największych osiągnięć w dziedzinie morfogenezy roślin w latach ostatnich. Od momentu ogłoszenia pierwszych prac Stewarda w 1958 r. dotyczących hodowli fragmentów łyka korzeni marchwi na pożywkach, ukazało się już wiele następnych doniesień i obszernych publikacji poświęconych otrzymaniu z pojedynczej komórki całych roślin wraz z ich organami rozrodczymi. Jak dotąd udało się otrzymać z pojedynczej komórki vegetatywnej w pełni rozwinięte rośliny 3 gatunków: *Daucus carota*, *Convolvulus arvensis*, *Nicotiana* (materiał wyjściowy tj. miękisz łodygi pochodził z mieszańca *N. tabacum* \times *N. glutinosa*). Prace te nawiązują do indukowania poliembrionii w warunkach hodowli in vitro, jednak obszerny ich zakres i duża liczba nie pozwalają na omówienie w niniejszym artykule.

PODSUMOWANIE

Poliembrionia jako szczególny przypadek rozmnażania vegetatywnego nie jest jeszcze dokładnie poznana i nie wiadomo jakie czynniki są bezpośrednio odpowiedzialne za wytwarzanie dodatkowych zarodków zdolnych do reprodukcji całego organizmu macierzystego. Sztuczne indukowanie dodatkowych zarodków

w różnych typach tkanek może być interesujące nie tylko z punktu widzenia różnicowania się komórek roślinnych i wykazania ich totipotencji, ale także może stanowić doskonałe źródło dla otrzymania roślin genetycznie czystych zawierających tylko cechy rośliny macecznej. Zarodki takie mogą stanowić bardzo korzystny materiał mający duże zastosowanie w pracach sadowniczych i rolniczych (np. drzewa



Rys. 6. Powstawanie pędów z embrionalnej masy *Fagopyrum sagittatum*: A — przekrój podłużny zalążka wraz z młodym zarodkiem w dniu wyszczepienia; B — zalążek po dwóch tygodniach hodowli; C — kultura po 6 tygodniach hodowli — z kalusa wyrastają pąki; D — pąk w przekroju podłużnym; E — siewka 10-tygodniowa otrzymana po przeniesieniu pąka na świeżą pożywkę; z — zarodek; k — kalus; p — pąk; zal. — zalążek. Wg Zenktelera 1966

owocowe *Mangifera* i *Citrus* można otrzymać z zarodków przybyszowych). Prace dotyczące sztucznego indukowania poliembrii na pożywkach należałoby prowadzić nie tylko do momentu otrzymania z dodatkowego zarodka siewki, ale hodować ją dalej (bądź to w warunkach naturalnych, bądź sztucznych) celem otrzymania kwiatów i następnie płodnych nasion. W dotychczasowych doświadczeniach

większość badaczy zadowala się samą możliwością wywołania poliembrii w warunkach sztucznych. Z pewnością natrafiają oni na szereg przeszkód, których nie potrafi się jeszcze dziś przewyciężyć. Niemniej jest to zadanie niezmiernie interesujące i metoda hodowli *in vitro* daje tu duże możliwości.

Z Katedry Botaniki Ogólnej UAM w Poznaniu

Literatura dotycząca całego tematu zostanie podana w części II artykułu «Zapylenie słupków i zapłodnienie zalążków *in vitro*».