

WITOLD PIWOWARCZYK

HODOWLA PROTOPLASTÓW ROŚLIN WYŻSZYCH *IN VITRO*

Istnieje wiele definicji protoplastu roślinnego. Termin ten został wprowadzony w 1880 r. przez Hansteina [35] jako zlepek słów „protos” — pierwszy i „plastos” — kształtować. Dla anatoma jest protoplast komórką roślinną pozbawioną ściany [27]. Ta poprawna w sensie formalnym definicja jest chętnie używana, jednakże — ze względu na swoją statyczność — nie mówi nam praktycznie nic o złożonej fizjologii protoplastu i tych jego cechach, które zdecydowały, że stał się on ostatnio bardzo modnym obiektem badań. Podobnie mało użyteczną i również tylko formalnie poprawną jest definicja nazywająca protoplastem tę część komórki, która daje się oddzielić od ściany [13]. W chwili obecnej nie istnieje wyczerpująca definicja tego pojęcia, która mogłaby zadowolić fizjologa. Konieczność stosowania definicji złożonej, ujmującej w sposób dynamiczny całokształt zagadnienia, a zwłaszcza jego aspekt fizjologiczny, podkreślili Mills i Krebs [59], twierdząc, że definicja protoplastu nie może być prostsza niż definicja komórki, z której go wyizolowano.

Nas w niniejszym artykule będzie interesować wycinek fizjologii protoplastu, jakim jest zdolność do dzielenia się i rozwoju w kulturach *in vitro*. Zagadnienie to jest niezwykle istotne, gdyż pozwala przenosić wynik modyfikacji dokonanych w bardzo dogodnym obiekcie, jakim jest nagi protoplast, na jednorodną genetycznie dużą populację komórek czy nawet na całe kwitnące rośliny.

Pierwsze udokumentowane uzyskanie protoplastów pochodzi z końca ubiegłego stulecia i zostało ogłoszone przez Klerckera w 1892 r. [51]. Autor dla izolacji protoplastów zastosował niezwykle prostą metodę, polegającą na krajanii splazmolizowanej tkanki i wypłukiwaniu do roztworu nielicznych protoplastów. W 1919 r. Giaja po raz pierwszy do izolacji protoplastów zastosował sok trawienny ślimaka *Helix pomatia*. Metoda enzymatyczna jest w chwili obecnej powszechnie stosowana, a liczne światowe firmy produkują całą gamę preparatów pozwalających skutecznie izolować nieuszkodzone protoplasty z większości gatunków roślin. Zaletą stosowania metod enzymatycznych jest nie tylko bardzo duża wydajność, ale również możliwość uzyskania czystej populacji protoplastów z określonej tkanki (np.:

miększy gąbczasty) [14, 39, 53]. Możliwość ta ma także, o czym później wspomnimy, poważne znaczenie w hodowli protoplastów.

W chwili obecnej badania nad protoplastami roślinnymi są prowadzone w licznych laboratoriach na całym świecie. Kluczowym w większości tych badań zagadnieniem, o czym zresztą już wspomniano powyżej, są techniki hodowli protoplastów *in vitro*. Opracowanie warunków hodowli dla nowego gatunku, zwłaszcza zaś uwieńczonej organogenezą, jest każdorazowo witane z dużym zainteresowaniem w środowisku naukowym i osiągnięcie takie już samo w sobie posiada dostateczną rangę, by przedstawione zostało drukiem w postaci artykułu lub krótkiego komunikatu [8, 22, 31]. Na obecnym etapie poznanie warunków hodowli dla jednego gatunku nie mówi nam praktycznie wiele nawet o hodowli gatunków pokrewnych należących do tego samego rodzaju [85]. Naturalnie, im większe pokrewieństwo roślin, tym większa jest szansa standaryzacji warunków hodowli, ale pewności nie mamy nigdy.

ZNACZENIE PRZYGOTOWANIA MATERIAŁU WYJŚCIOWEGO W HODOWLI PROTOPLASTÓW

Odróżnicowanie się protoplastów, odbudowa ściany komórkowej oraz podjęcie aktywności podziałowej zależy od wielkiej liczby czynników, które niestety w większości nie są nam jeszcze znane. Niektóre jednak z tych czynników w większym lub mniejszym stopniu zostały zbadane i przynajmniej w pewnym zakresie pozwalają sobą sterować.

Przygotowanie materiału roślinnego do izolacji protoplastów

W początkowym okresie badań nie przywiązywano większego znaczenia do jakości stosowanego materiału, w chwili obecnej jednak coraz powszechniej sądzi się, że pierwszym czynnikiem mogącym nawet zadecydować o powodzeniu eksperymentu są warunki hodowli roślin lub tkanek, z których zamierzamy izolować protoplasty. W zależności od stosowanego materiału wyróżniamy tutaj dwa sposoby postępowania.

W przypadku roślin rosnących w gruncie zabiegi adaptacyjne sprowadzają się do optymalizacji warunków środowiska. Wykazano, że szczególne znaczenie dla jakości uzyskanych protoplastów ma długość dnia, intensywność oświetlenia i wilgotność [40].

W przypadku stosowania sterylnego materiału rosnącego *in vitro* zabiegi sprowadzają się do tego, co niektórzy badacze nazywają standaryzacją materiału roślinnego, a co polega na długotrwałej, nieraz wielomiesięcznej, hodowli zawiesiny komórek, tkanek czy wręcz uzyskanych z merystemów całych roślin w pełnych pożywkach przystosowanych do kultur protoplastów [8, 30, 46]. Na znaczenie tego ostatniego zabiegu zwraca uwagę Donn [22], zaznaczając jednak, że dłu-

gotowały okres hodowli *in vitro* ma negatywny wpływ na potencjał morfogenetyczny, istnieje również ryzyko zmian w ploidalności komórki.

O ile optymalizacja czynników środowiskowych roślin rosnących w gruncie ma znaczenie tylko pośrednie, poprzez ograniczenie szkodliwego wpływu zabiegów izolacyjnych i poprawienie kondycji protoplastów, o tyle tzw. standaryzacja materiału roślinnego prowadzi do zmian w metabolizmie komórek, adaptacji do pożywki syntetycznej i ograniczenia szoku związanego ze zmianą środowiska.

Izolacja protoplastów

Kolejnymi czynnikami, które mają bardzo poważny wpływ na wynik hodowli, są sterylizacja, izolacja i oczyszczanie. Wszystkie te trzy czynniki działają poprzez ograniczenie wydajności i obniżenie kondycji izolowanych protoplastów. Jednakże komórki młode, które są szczególnie dogodnym materiałem do założenia hodowli, są znacznie łatwiej niszczone niż komórki dojrzałe [40, 82, 93]. Mamy więc tutaj do czynienia z niszczeniem najwartościowszego z punktu widzenia hodowli materiału, można nawet mówić o negatywnej selekcji niejednorodnego preparatu w trakcie procedury izolacji. Dla ograniczenia destrukcyjnego wpływu już w tej początkowej fazie podejmowano szereg działań, które łagodziły negatywny wpływ preparatyki. I tak — sterylizację dało się z powodzeniem ominąć stosując jałowy materiał roślinny pochodzący z kultur *in vitro* [31]. Powyższe jest o tyle istotne, że wydajność preparatyki izolacji protoplastów z tkanek *in situ* w warunkach jałowych jest często dwukrotnie niższa niż w przypadku pominięcia procesów sterylizacyjnych [23].

Podczas izolacji protoplastów jest obserwowany destrukcyjny wpływ zanieczyszczeń handlowych preparatów enzymatycznych, powodujących destabilizację plazmemy [18, 40] oraz wypłukiwanie metabolitów do roztworu enzymatycznego, spowodowane bardzo dużym gradientem ich stężeń pomiędzy protoplastem a środowiskiem. Toksyczne działanie preparatów enzymatycznych można obniżyć poprzez optymalizację stężeń poszczególnych składników, dobranie odpowiedniej temperatury oraz stosowanie czynników osłaniających, jak węgiel aktywny [24] czy sól potasowa siarczanu dekstranu [39]. W tym samym kierunku prowadzą działania polegające na dodatkowym oczyszczeniu handlowych preparatów enzymatycznych przy użyciu dializy czy sefideksu [46, 57]. Dla zapobieżenia wypłukiwaniu metabolitów stosuje się izolację enzymatyczną w roztworach hodowlanych, a dla uniknięcia rozwoju drobnoustrojów już na tym etapie można osłonowo stosować antybiotyki [52]. Wykazano również, że niebagatelne znaczenie dla skrócenia okresu izolacji ma mała głębokość kąpeli enzymatycznej, która nie powinna przekraczać 5—6 mm [40] oraz niska koncentracja materiału roślinnego, który — jak stwierdzono — dezaktywuje cellulazę [9]. Zarówno na tym przygotowawczym etapie jak również w późniejszej hodowli, bardzo duże znaczenie ma dobór substancji osmotycznie czynnej oraz jej stężenia [33, 40, 57]. Przeprowadzone badania porównawcze wykazały z jednej strony duże powinowactwo danego gatunku do

konkretnego związku oraz jego stężenia, z drugiej jednak okazało się, że przynajmniej na obecnym etapie nie jesteśmy zdolni do wykrycia zależności teoretycznych [57]. Analizując wpływ stężenia możemy stwierdzić, że stężenie zbyt niskie powoduje z jednej strony zwiększenie mechanicznej wrażliwości protoplastu, z drugiej natomiast — zwiększenie powierzchni dyfuzji. Zbyt wysokie stężenie natomiast powoduje — poprzez zbyt daleko posuniętą plazmolizę — nieodwracalne zmiany w cytoplazmie. Szkodliwość przemywania protoplastów sprowadza się do ich mechanicznego niszczenia. I ta procedura również przeprowadza negatywną z punktu widzenia dalszej hodowli selekcję materiału, z przyczyn tych samych jak opisane wyżej. Istnieje obecnie kilka technik przemywania protoplastów, jak: przemywanie na sączku membranowym, sedymentacja i flotacja. Najdelikatniejszą, a jednocześnie pozwalającą na rozfrakcjonowanie materiału, jest metoda wirowania w gradiencie skokowym [40, 41, 72]. Ta ostatnia metoda — dzięki możliwości zmieniania gęstości poszczególnych warstw gradientu — pozwala na przeprowadzenie celowej korzystnej selekcji protoplastów. Kolejnym poważnym niebezpieczeństwem, na które jeszcze dość często nie zwraca się dostatecznej uwagi, jest szok osmotyczny. Stwierdzono, że nawet krótkotrwały i niewielki (rzędu 30%) szok osmotyczny powoduje bardzo znaczne obniżenie trwałości protoplastów [95].

HODOWLA PROTOPLASTÓW ROŚLINNYCH

Posiadając czystą, wolną od enzymów i innych zanieczyszczeń, frakcję protoplastów można przystąpić do próby założenia hodowli. Dla uzyskania odróżnicowania i aktywności podziałowej protoplastów umieszcza się je w odpowiednio zestawionych pożywkach hodowlanych. Stosowane obecnie pożywki można podzielić na syntetyczne i półsyntetyczne. Te drugie są wzbogacone w takie substancje jak: mleczko kokosowe, woda kokosowa czy hydrolizat kazeiny. Wszystkie stosowane pożywki posiadają komplet potrzebnych pierwiastków w części mineralnej, a w sposób istotny różnią się częścią organiczną, w skład której wchodzi: cukier lub alkohol wielowodorotlenowy — jako substancja osmotycznie czynna i źródło węglowodanów — oraz witaminy i hormony roślinne. Ponadto w większości stosowanych pożywek są reprezentowane aminokwasy i antybiotyki. Niektóre pożywki dodatkowo są wzbogacone w inne cukry, zasady kwasów nukleinowych i wolne kwasy organiczne. Okazało się jednak, że również skład części mineralnej może mieć poważny wpływ na jakość pożywki. Zastąpienie części mineralnej pożywki KM [49] przez analogiczną część pożywki V-47 [7] znacznie podniosło jej przydatność dla protoplastów *Vicia faba* [9]. Do chwili obecnej opracowano bardzo wiele pożywek, a najważniejsze z nich, stosowane w większości prac, posiadają własne nazwy pochodzące najczęściej od nazwiska autora. Po raz pierwszy udało się uzyskać całą roślinę z protoplastu przy użyciu pożywki NT opracowanej w 1971 r. przez Nagata i Takebe [62] na bazie starszej pożywki MS (Murashige i Skoog, 61). Od tego czasu pożywka ta była stosowana z powodzeniem dla licznych gatunków roślin [1, 5, 55, 73, 75, 76, 94]. Inną bardzo często stosowaną pożywką jest

opracowany w 1968 r. przez Gamborga i wsp. [29] roztwór hodowlany B₅, przydatny zwłaszcza dla protoplastów marchwi [20, 25, 33, 38, 50, 69, 70, 71, 86]. W dalszej kolejności należy wymienić pożywkę DPD (Durand-Potrykus-Donn) opracowaną w 1973 r. do hodowli protoplastów *Petunia hybrida* [7, 23, 83] oraz pożywkę KM (Kao i Michayluk, 49) opracowaną dla *Vicia hajastana* [8, 9]. Inne wreszcie ważne, często powtarzające się w literaturze pożywki, to: NO (Nitsch i Ohyama) [11, 56, 65, 68], H (Harada) [21, 36, 37], MS (Murashige i Skoog) [9, 43, 61, 77], NN (Nitsch i Nitsch) [9, 64].

Badania nad hodowlą protoplastów idą niejako dwukierunkowo. Jedni badacze próbują opracować warunki hodowli dla konkretnych gatunków, modyfikując w tym celu i zestawiając w różnej kolejności pożywki istniejące lub opracowując nowe. Są to oczywiście badania niezwykle żmudne, gdyż wymagają nie tylko dużej intuicji badacza, ale również licznych eksperymentów metodą prób i błędów. Na obecnym etapie zaawansowania tych badań znalezienie jakichkolwiek zależności ogólnych byłoby niezwykle trudne. Pewne uogólnienia dałyby się wyprowadzić być może w zakresie stosowania fitohormonów, ale i tutaj różnorodność wariantów powoduje zbyt duże trudności interpretacyjne. Istnieje jednak druga grupa badaczy, która próbuje znaleźć takie zabiegi dodatkowe, które pozwoliłyby na wprowadzenie rozwiązań uniwersalnych przydatnych w hodowli większej liczby gatunków. Metody te najczęściej opierają się na dawno poczynionym spostrzeżeniu o korzystnym wpływie na hodowlę komórki czy protoplastu dodatkowego materiału biologicznego, rosnącego w tej samej pożywce. Mechanizm działania tych zabiegów nie został w sposób zadowalający wyjaśniony, jednakże ich skuteczność skłania wielu badaczy do korzystania właśnie z tej drogi [9, 77].

Oba kierunki badań mają swoje zalety i wady. W pierwszym przypadku posługujemy się wprawdzie syntetycznymi, dobrze zdefiniowanymi pożywkami, co nadaje im bardzo dużą powtarzalność, a równocześnie pozwala na wyciągnięcie wniosków o zależnościach metabolistycznych, lecz jednocześnie badania te trzeba powtarzać ponownie dla każdego gatunku czy nawet odmiany [85]. Mniejszą, przynajmniej na obecnym etapie, wartość teoretyczną mają te metody, które wprowadzają czynnik biologiczny, działający — co empirycznie stwierdzono — w sposób korzystny, ale oparty na nieznanym bliżej mechanizmie. Pomimo tej niedogodności, metody te — ze względu na swoją dużą skuteczność — są chętnie stosowane, zwłaszcza w przypadku, kiedy hodowla jest narzędziem, a nie obiektem badania.

Gęstość wysiewu

Podstawowym w wielu badaniach problemem, na jaki napotyka się podczas hodowli protoplastów, jest gęstość wysiewu. Wszystkie zbadane dotychczas obiekty mogą rosnąć wyłącznie w dużych gęstościach (rzędu 10⁴ protoplastów na 1 ml pożywki). Jest to bardzo duża niedogodność, gdyż w poważnym stopniu niweluje korzyści stosowania protoplastów, zwłaszcza w badaniach, których celem jest próba

izolacji mutantów czy heterokarionów. Spowodowane jest to faktem, że zbyt duża gęstość wysiewu uniemożliwia uzyskanie w wyniku hodowli jednolitego genetycznie materiału. Istnieje kilka koncepcji tłumaczących zjawisko konieczności obecności w pożywce odpowiednio dużej liczby protoplastów, by mogły one podjąć aktywność podziałową. Zazwyczaj przyjmuje się, że zbyt rzadki wysiew powoduje nadmierną utratę metabolitów pośrednich przez protoplasty. Spowodowane miało by to być zbyt niską koncentracją tych metabolitów w środowisku [34, 54, 80, 81, 88]. Okazuje się jednak, że nie bez znaczenia jest znacznie wyższa tolerancja dużej populacji protoplastów na czynniki toksyczne obecne w środowisku. Przeprowadzone badania nad *Vicia hajastana* wykazały, że gęsta populacja, tj. 10 tys. protoplastów w 1 ml, mogła rosnąć przy koncentracji glutaminy 500 mg/l, podczas gdy dla populacji małych już dwudziestokrotnie niższe stężenie było toksyczne w stopniu uniemożliwiającym wzrost [49].

W świetle powyższych uwag wydawać by się mogło, że zastosowanie dostatecznie bogatej pożywki o niskiej koncentracji poszczególnych składników, umożliwionej obecnością kolejnych metabolitów z cykli enzymatycznych, powinno rozwiązać ten problem. Poważnym argumentem za taką koncepcją było opracowanie dla protoplastów *Vicia hajastana* bardzo bogatej pożywki zawierającej oprócz soli mineralnych, sacharozy, glukozy, witamin i hormonów wzrostowych, również w kolejnych eksperymentach dodatkowo: kwasy trójkarboksylowe cyklu Krebsa, inne cukry i alkohole wielowodorotlenowe, komplet aminokwasów i zasad kwasów nukleinowych. Okazało się wtedy, że w takiej bogatej, ale dobrze zdefiniowanej, pożywce można było ograniczyć gęstość wysiewu protoplastów do zupełnie zadowalającej liczby 50/1 ml, bez ograniczenia ich aktywności podziałowej. Ponadto po wprowadzeniu wolnego od witamin hydrolizatu kazeiny i wody kokosowej, tj. mleka z dojrzałych kokosów ogrzewanego przez 30 min. do 60°C, udało się przeprowadzić hodowlę pojedynczego protoplastu w praktycznie dowolnie dużej objętości pożywki. Równocześnie — co ciekawe — okazało się, że po zastąpieniu protoplastów komórkami *Vicia hajastana* nie można było obniżyć gęstości wysiewu poniżej 2 kmórek/1 ml [49]. Wpływ wody kokosowej i hydrolizatu kazeiny tłumaczy się zawartością niezbędnych metabolitów pośrednich oraz substancji antytoksycznych [66, 67, 92]. Zupełnie nowe i nieoczekiwane światło na ten problem rzuciła nowsza praca poświęcona hodowli protoplastów *Vicia faba*. Od dawna było wiadomo, że niezdolność podziałową protoplastów niektórych gatunków udaje się przełamać po poddaniu ich fuzji z protoplastami dzielącymi się [45, 48]. W przypadku protoplastów *Vicia faba* wystarczyło poddać je jednoczesnej hodowli w tej samej pożywce z dzielącymi się protoplastami *Petunia hybrida*, by uzyskać aktywność podziałową dla obydwu gatunków. Ale okazało się również — i to w tym eksperymencie było najbardziej nieoczekiwane — że pożywka, w której uprzednio były hodowane protoplasty *Petunia*, nie była w stanie pobudzić protoplastów *Vicia* do podziałów [9]. Dotychczasowa koncepcja wymaga więc co najmniej dwóch alternatywnych, nie wykluczających się, uzupełnień: albo dla pewnych przynajmniej gatunków traconym metabolitem pośrednim jest związek o bardzo krótkim okresie półtrwania, albo też związki toksyczne, jeżeli nawet pochodzą

z pożywki, są dezaktywowane bardzo nietrwałym związkiem, a działanie jego polega na wyrównaniu zachwianej równowagi reakcji enzymatycznej. Najprawdopodobniej mamy tu do czynienia ze zjawiskiem dynamicznym, łączącym obydwie procesy i będącym wypadkową dyfuzji przez błony, szybkości syntezy nietrwałych związków i gęstości wysiewu. Towarzyszące wzbogacaniu pożywki zmniejszanie wymagań co do gęstości wysiewu mogło być w świetle powyższych rozważań interpretowane jako skrócenie szlaków metabolicznych pomiędzy nieznanym, nietrwałym metabolitem a dostępnym w pożywce związkiem. W pożywkach bardzo bogatych szybkość syntezy owych nietrwałych kluczowych związków byłaby więc tak wysoka, że równoważyłaby z powodzeniem dyfuzję przez błony. Za taką interpretacją przemawiałyby również wyniki uzyskane dla *Vicia norbenensis*, gdzie okazało się, że dodatek tylko trzech związków, tj. asparaginy, glutaminy i seryny zwiększał aż dziesięciokrotnie ilość dzielących się protoplastów, podczas gdy dodatek mleka kokosowego i hydrolizatu kazeiny, jak również pojedynczo — glutaminy i seryny, był bez znaczenia, a w przypadku dodania wyłącznie asparaginy wpływ ten był nieznaczny [22]. Wydaje się więc, że to nie utrata któregoś z tych związków, ale produktu ich syntezy, miała tak poważny wpływ na aktywność podziałową protoplastów, gdyż zarówno mleko kokosowe jak i hydrolizat kazeiny zawierały je również, czyli dopiero ich nadmiar był istotny.

Problem maksymalnego obniżenia gęstości wysiewu próbowano rozwiązać kilkoma metodami. Powyżej omówiono metodę wzbogacania pożywki w cały szereg związków, z których niektóre mogły być ważnymi metabolitami [49]. Bardzo efektywną metodę zastosowano dla protoplastów tytoniu. Posłużono się mianowicie warstwą odżywiającą, zatopioną w agarze, o gęstości wysiewu 4×10^4 protoplastów w 1 ml. Warstwa odżywcza była naświetlana promieniami X, na nią wylano drugą warstwę o gęstości wysiewu 5—50 protoplastów/1 ml. Naświetlone protoplasty same wprawdzie nie dzieliły się, jednakże zapewniały — tym dzielącym się w górnej warstwie — niezbędną do rozwoju gęstość wysiewu, nie powodując równocześnie negatywnych zmian w materiale genetycznym powstających kolonii [77, 78]. Ostatnio opracowano niezwykle prostą procedurę, która — jak się wydaje — będzie mogła w niezmienionej formie być zastosowana dla protoplastów wszystkich gatunków. Jako punkt wyjścia przyjęto spostrzeżenie, że istotny jest tylko stosunek ilości protoplastów do objętości pożywki, zredukowano więc tę objętość do tzw. mikrokropki (0,25—0,5 μ l), w której znajdował się tylko jeden protoplast. Po 2—3 tyg., gdy dysponowano już koloniami, przeniesiono je do tego samego medium o objętości 25—50 μ l [32].

Warto w tym miejscu również zaznaczyć, że stosowanie małych hodowli (rzędu 100 μ l i mniej) jest z wielu względów korzystniejsze, niż posługiwanie się dużymi objętościami [44, 74, 87, 90]. Poważnym problemem jest jednak w przypadku stosowania małych hodowli relatywnie duże parowanie prowadzące do nadmiernego zagęszczenia pożywki [19, 87]. Niedogodność ta została jednak skutecznie rozwiązana, gdy opracowano ostatnio nowy rodzaj naczyń szklanych, specjalnie przystosowany do hodowli małych populacji protoplastów roślinnych [17]. Naczynia te skutecznie spełniają dodatkowo inny postulat, jakim jest możliwość ho-

dowli protoplastów w cienkiej warstwie pożywki, co — jak wykazano — jest korzystniejsze od stosowania kropli wiszącej [49].

Zazwyczaj w hodowli protoplastów przeprowadza się wielokrotne pasażę, stosując najczęściej standartowe roztwory hodowlane zestawione w różnej kolejności, w zależności od badanego gatunku [8, 23, 28, 42, 83, 85]. Zmianę medium hodowlanego stosuje się w kluczowych etapach. W pierwszym medium protoplasty przechodzą odróżnicowanie i podziały do stadium kolonii. W medium drugim następuje przejście kolonii w kallus, który podlega dalszym pasażom dla uzyskania pędów i korzeni. Ciekawe, a równocześnie utrudniające pracę, jest to, że to samo medium — w zależności od gatunku — może być korzystne dla innych etapów, np.: dla protoplastów *Nicotiana tabacum* stosuje się dla regeneracji aż do stadium kolonii medium NT, w dalszych etapach zastępując je innymi [62], podczas gdy dla protoplastów *Petunia hybrida* medium NT jest odpowiednie dopiero dla inicjacji embriogenezy z kallusa [23]. Rzadziej używa się jednego rodzaju roztworu hodowlanego dla całego cyklu rozwojowego aż do stadium rośliny [33], ale i w tym przypadku stosuje się pasażę i nieznaczne modyfikacje, dodając np. w kolejnych etapach agar czy modyfikując rodzaj i stężenie cukrów. Należy wreszcie podkreślić, że stosowane roztwory standartowe są zazwyczaj w zależności od potrzeb modyfikowane przez badaczy. Dotyczy to zwłaszcza w sposób oczywisty rodzaju i stężenia fitohormonów, ale nie wyłącznie.

Metody przełamania inercji podziałowej

Na podobnej zasadzie jak omówione już zagadnienie konieczności stosowania wysokiej gęstości wysiewu, również problem inercji podziałowej protoplastów próbowano rozwiązać nie tylko metodami operowania różnorodnymi pożywkami, ale także przy zastosowaniu metod uniwersalnych. Temu celowi miało służyć wzmiankowane już przeprowadzanie fuzji protoplastów dzielących się i nie dzielących, co zapewniało podziały obydwu komponentom [45, 48], stosowanie hodowli w postaci kokultury z protoplastami dzielącymi się [9], czy wreszcie opracowane ostatnio dla protoplastów *Vicia norbenensis* stosowanie wstępnej inkubacji fragmentów liści w pełnej pożywce hodowlanej. W inkubowanych fragmentach liści następowało pojawienie się komórek quasimerystematycznych, które były mniejsze, bogatsze w cytoplazmę oraz posiadały uwstecznione chloroplasty. Po enzymatycznym usunięciu ścian komórkowych protoplasty podejmowały podziały, co nie następowało dla komórek pochodzących bezpośrednio z mezofilu [22]. Dotykamy w tym miejscu bardzo istotnego zagadnienia, jakim jest utrata przez komórki wyspecjalizowane zdolności podziałowej, i tak np.: protoplasty pochodzące z bardzo słabo relatywnie wyspecjalizowanych komórek mięksiszu palisadowego dzielą się gorzej, niż pochodzące z mięksiszu gąbczastego [62]. Jeżeli poprawna jest interpretacja opisanej powyżej procedury dla *Vicia norbenensis*, metoda ta będzie mogła być przeniesiona na liczne rośliny o dużej zdolności regeneracyjnej liści, jak np.: *Begonia* sp., jeżeli natomiast, co jest mniej możliwe, zachodziły tutaj złożone procesy adaptacyjne, metoda ta może okazać się uniwersalna, na co warto zwrócić uwagę.

Zmiany zachodzące w hodowanych protoplastach

W przypadku starannej procedury świeżo izolowane protoplasty są sferyczne i posiadają równomiernie rozłożone chloroplasty. Jednakże już po kilku godzinach można zaobserwować pierwsze zmiany, jak wzrost objętości oraz przemieszczenie chloroplastów, świadczące o początkach regeneracji [31]. W dalszej kolejności — po ok. 24—96 godz. — następuje przyjęcie kształtu owalnego [31, 42], co świadczy o początkach odbudowy ściany komórkowej [33, 47], Równoległe z odbudową ściany komórkowej następują pierwsze podziały, które doprowadzają do powstania kolonii komórkowych. Odbudowie ściany komórkowej towarzyszy wzrost liczbowy mitochondriów, rybosomów i cystern ER oraz pojawienie połączeń między plazmalemą a cysternami systemu ER [16, 79]. Na powierzchni protoplastów można obserwować dwa rodzaje cząstek posiadających odrębną orientację przestrzenną. Istnieje sugestia, że syntetyzowane w cytoplazmie prekursorzy celulozy są przenieszone przez jedne z tych cząstek, drugie natomiast są odpowiedzialne za biosyntezę i orientację mikrofibryli [79].

W świetle ostatnich doniesień protoplasty są najlepszymi w świecie roślin obiektami do manipulacji genetycznych [52]. Aby można było to osiągnąć, musi się uprzednio znaleźć metodę przeniesienia zmodyfikowanej cechy na organizmy roślinne. Temu głównie celowi służą próby hodowli protoplastów. Dla dużej liczby gatunków udało się już uzyskać aktywność podziałową protoplastów [20, 58, 60]. Znacznie rzadsze są doniesienia o uorganizowaniu się kolonii w kallus [2, 15, 26]. Ponadto, dzięki pracy licznych laboratoriów na całym świecie, znane są już dzisiaj dla kilkunastu gatunków roślin warunki hodowli od pojedynczego protoplastu aż do stadium embriogenezy czy nawet całych roślin [4, 8, 10, 23, 31, 33, 63, 85, 89]. Jeszcze rzadsze są doniesienia na temat regeneracji protoplastów haploidalnych czy dihaploidalnych, ale i ona powiodła się dla kilku gatunków [3, 6, 12, 68, 83, 85, 91]. Hodowla haploidalnych protoplastów ma bardzo duże znaczenie, gdyż nadają się one doskonale do izolacji mutantów z cechą recesywną [84, 85].

W chwili obecnej badania nad hodowlą protoplastów roślinnych są bardzo zaawansowane i należy sądzić, że już wkrótce opracowane będą metody regeneracyjne dla większości gatunków. Bardzo znacznie przyspieszyło by ten moment znalezienie rozwiązań uniwersalnych, a wydaje się, że nad tym właśnie pracuje duża grupa badaczy.

LITERATURA

- [1] Ambid Ch., Delmestre M. H., Fallot J., 1974. C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D 279, 1429—1432.
- [2] Arnold S., Eriksson T., 1976. *Physiol. Plant.* 36, 193—196.
- [3] Bajaj Y. P. S., 1972. *In Vitro* 7, 260.
- [4] Bajaj Y. P. S., 1977. Protoplasts isolation culture and somatic hybridization, (w) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, red. J. Reinert i Y. P. S. Bajaj, Berlin—Heidelberg—New York: Springer.

- [5] Beasley C. A., Ting J. P., Linkins A. E., Birnbaum E. H., 1974. 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, 169—192.
- [6] Binding H., 1974. *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 327—336.
- [7] Binding H., 1974. *Plant. Sci. Lett.* 2, 185—188.
- [8] Binding H., Nehls R., 1977. *Z. Pflanzenphysiol.* 85, 279—280.
- [9] Binding H., Nehls R., 1978. *Z. Pflanzenphysiol.* 88, 327—332.
- [10] Boules M., Evans P. K., 1976. *Plant Sci. Lett.* 7, 409—416.
- [11] Bourgin J. P., Chupeau Y., Missonier C., Morel G., 1973. Fusion de protoplastes de tabac, (w) *Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales*, Colloq. intern. C. N. R. S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris, 429—435.
- [12] Bourgin J. P., Missonier C., Chupeau Y., 1976. *C. R. Acad. Sci. Paris* 282, 1853—1856.
- [13] Breuner S., 1955. *Nature* 181, 1713—1715.
- [14] Brunori A., Ancora G., 1977. *Z. Pflanzenphysiol.* 81, 95—101.
- [15] Bui-Dang-Ha D., Noreel B., Masset A., 1975. *J. Exp. Bot.* 26, 263—267.
- [16] Burgess J., Fleming E. N., 1974. *J. Cell Sci.* 14, 439—447.
- [17] Button J., 1978. *Z. Pflanzenphysiol.* 87, 187—190.
- [18] Cocking E. C., 1972. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 29—50.
- [19] Constabel F., 1975. Isolation and culture of plant protoplasts, (w) *Plant tissue culture methods*, red. O. Gamborg i L. Wetter, N. R. CC Sashatoon, 11—27.
- [20] Constabel F., Kao K. N., 1974. *Can. J. Bot.* 52, 1603—1606.
- [21] Coutts R. H. A., Wood K. R., 1975. *Plant Sci. Lett.* 4, 189—193.
- [22] Donn G., 1978. *Z. Pflanzenphysiol.* 86, 65—75.
- [23] Durand J., Potrykus I., 1973. *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 26—34.
- [24] Eriksson T., Bonnett H., Glimelius K., Wallin A., 1974. Technical advances in protoplasts isolation, culture and fusion, (w) *Tissue culture and plant science*, red. H. E. Street, Academic Press, London, 213—231.
- [25] Fowke L. C., Bech-Hansen C. W., Gamborg O. L., Shyluk J. P., 1973. *Am. J. Bot.* 60, 304—312.
- [26] Fowke L. C., Rennie P. J., Kirkpatrick J. W., 1976. *Planta* 130, 39—46.
- [27] Frey-Wyssling A., 1967. *Nature* 216, 516.
- [28] Furner J., King J., Gamborg O. L., 1978. *Plant Sci. Lett.* 11, 169.
- [29] Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima O., 1968. *Exptl. Cell. Res.* 50, 151—158.
- [30] Gatemby A., Cocking E. C., 1977. *Plant Sci. Lett.* 8, 275—280.
- [31] Gill M., Rashid A., Maheshavari S., 1978. *Protoplasma* 96, 375—379.
- [32] Gleba J. J., 1978. *Naturwissenschaften* 65, 158—159.
- [33] Grambow H. J., Kao K. N., Miller R. A., Gamborg O. L., 1972. *Planta* 103, 348—355.
- [34] Ham R., 1973. Dilution plating nutritional considerations A. *Animal cells*, (w) *Tissue culture methods and applications*, red. P. F. Kruse Jr. i M. K. Patterson Jr., Acad. Press, New York, 254—261.
- [35] Hanstein J., 1880. *Bot. Abhandlungen* 4, 1—56.
- [36] Harada H., 1973. *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 77—80.
- [37] Harada H., 1973. Culture in vitro de protoplastes obtenus a partir de tissu foliaire d'*Ipomoea hederifolia* et de *Calystegia sepim* (L.) R. Br., (w) *Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales*, Colloq. intern. C. N. R. S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris, 127—131.
- [38] Hartman J. X., Kao K. N., Gamborg O. L., Miller R. A., 1973. *Planta* 112, 45—56.
- [39] Hovrath G., Droppa M., Mustardy L. A., Faludi-Daniel A., 1978. *Planta* 141, 239—245.
- [40] Hughes B. G., White F. G., Smith M. A., 1978. *BPP* 172, 67—77.
- [41] Hughes B. G., White F. G., Smith M. A., 1978. *BPP* 172, 223—231.
- [42] Kameya T., Uchimya H., 1972. *Planta* 103, 356—360.
- [43] Kameya T., 1973. *Planta* 115, 77—82.
- [44] Kao K. N., 1977. *Molec. Gen. Genet.* 150, 225.
- [45] Kao K. N., Constabel F., Michayluk M. R., Gamborg O. L., 1974. *Planta* 120, 215—227.
- [46] Kao K. N., Gamborg O. L., Miller R. A., Keller W. A., 1971. *Nature* 232, 124.

- [47] Kao K. N., Keller W. A., Miller R. A., 1970. *Exp. Cell Res.* 62, 338—340.
- [48] Kao K. N., Michayluk M. R., 1974. *Planta* 115, 355—367.
- [49] Kao K. N., Michayluk M. R., 1975. *Planta* 126, 105—110.
- [50] Kartha K. K., Michayluk M. R., Kao K. N., Gamborg O. L., Constabel F., 1974, *Plant Sci. Lett.* 3, 265—271.
- [51] Klercker J., 1892, *Ofvers Vetensk Acad, Forh. Stockholm* 49, 463—475.
- [52] Liebke B., Hess D., 1977, *BPP* 171, 493—501.
- [53] Marchatti S., Ancora G., Brunori A., 1976, *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 307—313.
- [54] Marezki A., Thonn M., Nickell L. G., 1974, *Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures*, (w) *Tissue culture and plant science*, red. H. E. Street, Acad. Press, London, 329—361.
- [55] Mehra-Palta A., Palta H., K., Hermann R. G., 1975, *IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts*, Nottingham, 84.
- [56] Messerschmidt M., 1974, *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 175—178.
- [57] Michayluk M. R., Kao K. N., 1975, *Z. Pflanzenphysiol.* 75, 181—185.
- [58] Miller R. A., Gamborg O. L., Keller W. A., Kao K. N., 1971, *Canad. J. Genet. Cytol.* 13, 347—353.
- [59] Mills A., Krebs H., 1968, *Aspects of yeast metabolism*, Oxford: Blackwell, 12.
- [60] Motoyoshi F., 1971, *Exptl. Cell Res.* 68, 452—456.
- [61] Murashige J., Skoog F., 1962, *Physiol. Plant.* 15, 473—497.
- [62] Nagata T., Takebe I., 1971, *Planta* 99, 12—20.
- [63] Nagay J., Maliga P., 1976. *Z. Pflanzenphysiol.* 78, 453—455.
- [64] Nitsch J. P., Nitsch C., 1969, *Science* 163, 85—87.
- [65] Nitsch J. P., Ohyama K., 1971, *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser. D*, 273, 801—804.
- [66] Nolan R., 1971, *Mycologia* 63, 1231—1234.
- [67] Nolan R., Nolan W., 1972, *Appl. Microbiol.* 24, 290—291.
- [68] Ohyama K., Nitsch J. P., 1972, *Pl. Cell Physiol.* 13, 229—236.
- [69] Ohyama K., Pelcher L. E., Horn D., 1977, *Plant. Physiol.* 60, 98—101.
- [70] Ohyama K., Pelcher L. E., Horn D., 1977, *Plant Physiol.* 60, 179—181.
- [71] Pelcher L. E., Gamborg O. L., Kao K. N., 1974, *Plant Sci. Lett.* 3, 107—111.
- [72] Piwowarczyk W., 1979, *BPP*, 174, 318—321.
- [73] Poirier-Hamon S., Rao P. S., Harada H., 1974, *J. Exp. Bot.* 25, 752—760.
- [74] Potrykus I., Harms C., Lörz H., 1976, (w) *Cell genetics in higher plants*, red. Dudits et al, Budapest: Akademiai Kiado.
- [75] Power J. B., Frearson E. M., 1973, *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 vegetales*, Colloq. intern. C. N. R. S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris, 410—421.
- [76] Premecz G., Foglein F., Kalpagam C., Nyitrai A., Farkas G. L., 1975, *IV International Symposium on Yeast and Other Protoplasts*, Nottingham, 76.
- [77] Raveh D., Galun E., 1975, *Z. Pflanzenphysiol.* 76, 76—79.
- [78] Raveh D., Huberman E., Galun E., 1973, *In Vitro* 9, 216—222.
- [79] Robenek H., Peveling E., 1977, *Planta* 136, 135—145.
- [80] Ruesink A., 1973, *Surface membrane properties of isolated protoplasts*, (w) *Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales*, Colloq. intern. C. N. R. S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris, 41—49.
- [81] Sargent P., King P. J., 1974, *Canad. J. Bot.* 52, 1747—1755.
- [82] Schaskolskaya N. D., Sacharovskaya G. N., Sacharova E. W., 1973, *The optimal conditions for isolation and incubation of barley mesophyll protoplasts*, (w) *Protoplastes et fusion de cellules somatiques vegetales*, Colloq. intern. C. N. R. S. 212, red. J. Tempe, INRA, Paris, 93—98.
- [83] Schieder O., 1975, *Z. Pflanzenphysiol.* 76, 462—466.
- [84] Schieder O., 1976, *Molec. Gen. Genet.* 149, 251—254.
- [85] Schieder O., 1977, *Z. Pflanzenphysiol.* 84, 275—281.

- [86] Skene K. G. M., 1974, *Austr. J. Pl. Physiol.* 1, 371—376.
- [87] Street H. E., 1973, *Cell suspension culture — techniques*, (w) *Plant tissue and cell culture*, red. H. E. Street, Oxford: Blackwell, 59—99.
- [88] Stuart E., Street H. E., 1971, *J. Exp. Bot.* 22, 96—106.
- [89] Takebe I., Labib G., Melchers G., 1971, *Naturwiss.* 58, 318—320.
- [90] Thomas E., Davey M. R., 1975, *From single cells to plants*, London.
- [91] Thomas E., Hoffmann F., Potrykus I., Wenzel G., 1976, *Molec. Gen. Genet.* 145, 245—248.
- [92] Tulechke W., Weinstein L., Rutner A., Laurencot H., 1961, *Contr. Bayce Tompson Inst.* 21, 115—128.
- [93] Wakasa K., 1973, *Japan J. Genet.* 48, 279—289.
- [94] Watts J. W., King J. M., 1973, *Z. Naturforschg.* 28c, 231—236.
- [95] Zuily-Fodil Y., Passaquet C., Esnault R., 1978, *Plant Physiol.* 43, 201—204.

Adres autora:

MGR WITOLD PIWOWARCZYK

Zakład Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Molekularnej UJ,
31-001 Kraków, ul. Grodzka 53