

TERESA ORLIKOWSKA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

MARIA CHRZĄSTEK

Akademia Rolnicza w Lublinie

KULTURY ZARODKÓW ROŚLINNYCH *IN VITRO* I MOŻLIWOŚCI ICH WYKORZYSTANIA W HODOWLI

Historia hodowli in vitro zarodków roślinnych

Hodowla zarodków roślinnych poza macierzystymi tkankami bielma i nasion interesowała biologów od dość dawna. Pierwsze wzmianki o uzyskiwaniu roślin z wyizolowanych zarodków pochodzą z roku 1754, kiedy to Bonnet wysiewał zarodki dojrzałych nasion *Phaseolus* i *Fagopyron* bezpośrednio do ziemi [16]. Hodowla zarodków *in vitro*, tzn. w szkle, w szerszym pojęciu w warunkach sztucznych, aseptycznych, rozpoczęła się od czasu publikacji prac Hänniga [1904, cyt. 16], który prowadził obszernie badania nad wzrostem zarodków *Raphanus* i *Cochlearia* na różnych pożywkach zawierających cukry, sole mineralne, aminokwasy, ekstrakty roślinne, żelatynę i produkty degradacji białek w sterylnych kulturach. On też, jako pierwszy zwrócił uwagę na różne zachowanie się w hodowli, zarodków dojrzałych i niedojrzałych. Te ostatnie wytwarzały od razu małe siewki z pominięciem normalnych stadiów embriogenezy. Zjawisko to znane jako „kielkowanie przedwczesne” wykazuje znaczne odchylenie morfologiczne od embronicznego typu rozwoju, który polega na szybkich podziałach i zróżnicowaniu komórek, połączonych z minimalnym wydłużaniem lub z całkowitym brakiem powiększania ich rozmiarów. Kielkowanie przedwczesne charakteryzuje się natomiast przede wszystkim wydłużaniem komórek i małą intensywnością podziałów. Ten typ kielkowania następuje bez zachowania przerwy spoczynkowej pomiędzy embriogenezą a stadium siewek, zazwyczaj wtedy, nim zarodek osiągnie pełny rozwój [19]. Kielkowanie takie jest bardzo niekorzystne, ponieważ powstałe siewki są słabe i zwykle zamierają.

Nad zagadnieniem dotyczącym kielkowania przedwczesnego pracował także Dietrich [1924, cyt. 16, 22], a w latach sześćdziesiątych Norstog [16, 18, 19, 20]. Dietrich prowadził badania nad wzrostem zarodków należących do różnych rodzin, na pożywce Knopa z dodatkiem 5—10% sacharozy i 1,5% agaru. Jego główne zasługi polegały na sformułowaniu pewnych wniosków dotyczących okresu spoczynkowego zarodków, za-

leżnych od warunków hodowli. Stwierdził on, że zarodki wykładane na powierzchnię pożywki miały tendencję do szybszego kiełkowania niż zarodki zanurzone w pożywce oraz, że nie jest możliwa skuteczna hodowla *in vitro* zarodków wyizolowanych przed osiągnięciem przez nich 1/3 rozmiarów zarodka dojrzałego. Podobnie La Rue [1936, cyt. 16], uważał, że zarodki różnych gatunków, mniejsze od 0,5 mm, nie są zdolne do normalnego rozwoju w kulturach *in vitro*.

Od 1925 roku prowadzono próby nad otrzymaniem roślin mieszańcowych z nieżywotnych nasion, wytworzonych w wyniku krzyżowań oddalonych. Wyniki były pozytywne o ile zarodki były dostatecznie zróżnicowane w czasie izolowania. Okazało się, że te pozornie nieżywotne zarodki są zdolne do normalnego rozwoju po dostarczeniu składników pokarmowych w pożywce [22].

Począwszy od lat trzydziestych prowadzono wiele prac przy wykorzystaniu metodyki kultur zarodków *in vitro*, dotyczących fizjologii tworzenia zarodków i nasion, warunków spoczynku i kiełkowania nasion różnych gatunków oraz fizjologii wzrostu zarodków roślin pasożytniczych [22]. W wyniku szeregu obserwacji dokonanych na zarodkach różnych gatunków okazało się, że zarodki dojrzałe, zróżnicowane, mogą po wyizolowaniu rosnąć na prostych pożywkach, składających się ze źródła węgla i soli mineralnych. Inne natomiast są wymagania pokarmowe prazarodków i zarodków niedojrzałych. Według Sujeta [1924, cyt. 15] za prazarodki można uważać stadia począwszy od zygoty jednokomórkowej do czasu wytworzenia się jedno- lub dwubocznej symetrii, według Snarfa (1927) natomiast, do czasu pojawienia się przegród podłużnych w dzielącym się tworze. Marry [1941, cyt. 18] definiuje prazarodek, jako zarodek niezróżnicowany zewnętrznie. Stadia późniejsze, od czasu wykształcenia się wszystkich typowych struktur, to stadia określane jako zarodki niedojrzałe.

Bardzo długo nie osiągnano sukcesów w hodowli prazarodków i zarodków słabo zróżnicowanych. Na przykład zarodki *Portulaca*, izolowane w stadium serca, powiększały się co prawda, ale nie zróżnicowały się i wreszcie zamierały [22]. Stwierdzono, że istnieje wielkość progowa, charakterystyczna dla zarodków różnych gatunków, poniżej której ich hodowla nie jest skuteczna.

Po raz pierwszy sukces w hodowli prazarodków osiągnięto w wyniku włączenia do pożywki mleka kokosowego [Van Overbeek et al. 1941, 1942, cyt. 22]. Prazarodki *Datura* o początkowej długości 0,15 mm, zwiększyły kilkakrotnie rozmiary w ciągu 7-dniowego okresu hodowli.

W roku 1963 Raghavan i Torrey [cyt. 22] ogłosili wyniki badań dotyczące wymagań pokarmowych różnych stadiów rozwojowych zarodków

Capsella bursa-pastoris. Był to pierwszy przypadek otrzymania roślin z prazarodków w wyniku hodowli *in vitro*.

Skład pożywki powodującej różnicowanie prazarodków *Hordeum vulgare* opracował Norstog [18, 19, 20]. Pożywka ta jest skuteczna w hodowli prazarodków o długości 0,2 mm. Równocześnie okazało się, że prazarodki o długości 0,1 mm lub mniejsze po wyizolowaniu nie rosną według żadnych zasad morfogenetycznych ani nie tworzą zarodków typowych, a zamiast tego struktury protokormopodobne. Pożywka pozwalająca na rozwój tak młodych zarodków jęczmienia składa się z makro- i mikroelementów, witamin i aminokwasów, a istotne dla jej skuteczności są: wysoki poziom sacharozy, źródło azotu w postaci jabłczanu amonu oraz pH 4,9.

Ogólny wniosek dotyczący wymagań pokarmowych zarodków w hodowli *in vitro* jest taki, że im mniejszy zarodek, tym bardziej kompleksowa pożywka jest potrzebna dla kontynuowania wzrostu i zróżnicowania. Powinna ona być zbliżona, a dla najmłodszych stadiów identyczna jak macierzyste bielmo, a więc specyficzna dla różnych genotypów.

Do dziś, hodowla prazarodków i młodych zarodków niedojrzałych prowadzona jest z małą skutecznością. Jeszcze gorsze wyniki otrzymuje się w przypadku hodowli młodych zarodków mieszańcowych. Większość z nich zamiera lub jedynie powiększa rozmiary.

Istnieje pogląd, że wykształcenie symetrii i rozpoczęcie zróżnicowania jest możliwe jedynie wtedy, gdy przynajmniej najwcześniejsze stadia, a więc stadium zygoty i wczesnej globuli zarodek odbywa w środowisku naturalnym, tj. w zalążni [18].

Obecnie prowadzone eksperymenty polegają na manipulowaniu składem pożywki, jej odczynem oraz ciśnieniem osmotycznym. Istotne jest stwórczenie takich warunków, aby młode zarodki wolno kontynuowały rozwój embrionalny, wykształcając wszystkie typowe elementy. Warunki te muszą być związane ze zdolnością biosyntetyczną zarodków, które w fazie heterotroficznej nie posiadają enzymów do tworzenia końcowych produktów metabolizmu, takich jak np. aminokwasy czy nukleotydy [4].

Zastosowanie hodowli zarodków *in vitro*

1. Hodowla zarodków *in vitro* stwarza możliwość badania morfogenetycznych i morfofizjologicznych aspektów embriogenezy, a więc wzrostu i zróżnicowania zarodków, a także korelacji zachodzących w procesie embriogenezy między zarodkiem, endospermem a tkankami organizmu matcznego oraz bada możliwości kierowania tymi zjawiskami. Wyniki badań czynników wpływających na odżywianie, wzrost

i zróżnicowanie zarodków poza środowiskiem zalążni, wywarły wpływ między innymi na rozwiązywanie problemów zróżnicowania i morfogenezy w hodowli tkanek somatycznych [29].

2. Badania nad fizjologią spoczynku nasion przy wykorzystaniu metody hodowli zarodków *in vitro* pozwoliły między innymi na wyjaśnienie mechanizmu wernalizacji. Badania te dotyczą zlokalizowania i identyfikacji endogennych inhibitorów lub promotorów kiełkowania oraz poznanie możliwości kierowania nimi. Ma to praktyczne znaczenie w hodowli niektórych roślin ogrodniczych, jak irysy, róże czy brzoskwinie, których nasiona wymagają długiego okresu kiełkowania. Dzięki hodowli zarodków na pożywkach sztucznych można wyeliminować inhibicyjne działanie endospermu (Irys), lub też otrzymywać dwa pokolenia rocznie, co ma istotne znaczenie w szybkości selekcji róż [29].

3. Najszersze zastosowanie ma hodowla zarodków *in vitro* dla otrzymania roślin z niepełnowartościowych nasion, które często powstają przy oddalonym krzyżowaniu, w szybko dojrzewających odmianach drzew owocowych lub winorośli, przy apomiksji i poliembrionii, a także z powodu niesprzyjających warunków pogody. Uzyskanie roślin w takich przypadkach ma wielkie znaczenie praktyczne dla prac hodowlanych [22, 23, 29].

Otrzymywanie roślin z zarodków mieszańcowych w wyniku hodowli in vitro

Przy krzyżowaniu, szczególnie oddalonym, może występować szereg nieregularności, które mogą prowadzić ostatecznie do zamierania zarodków. Rozwój zarodka może ulec zahamowaniu na wszystkich etapach rozwoju embrionalnego, a przyczyny tego zahamowania mogą być różne, zależnie od przypadkowych różnic w genotypach komponentów krzyżówkowych [24]. W pewnych krzyżówkach degeneracja zarodka następuje po skutecznym zapłodnieniu z powodu niezgodności uwarunkowanej genetycznie [23]. Proces ten zachodzi bardzo wcześnie, w stadium jedno- lub kilkukomórkowej zygoty, a otrzymanie roślin nie jest możliwe. Najczęściej jednak obumieranie jest spowodowane dysharmonią pomiędzy bielmem a zarodkiem. Jak wiadomo bielmo zaczyna rozwijać się nieco wcześniej niż zarodek. Na przykład u *Triticale* zapłodnienie wtórnego jądra następowało w ciągu 4—5 godzin po zapyleniu, a pierwszy podział jądra endospermu 2—3 godziny później. Komórka jajowa natomiast była zapładniana po 10—15 godzinach od zapylenia, a pierwszy podział zygoty miał miejsce 15—20 godzin później [10]. Nienormalny rozwój bielma przejawia się w nietypowych mitozach, powolnym wzros-

cie, często następuje zahamowanie podziałów komórek oraz rozpuszczanie ścian komórkowych i fuzja protoplastów a także jąder. Czasem, odwrotnie, rozrost endospermu jest nadmierny. Obumieranie zarodka może rozpocząć się wtedy, gdy bielmo nie wykazuje jeszcze oznak degenerowania, a także w trakcie tych procesów lub po ich zakończeniu [23]. W pewnych przypadkach sugerowano, że na zniekształcenie endospermu może mieć wpływ sam zarodek, komórki antypod lub tkanki osłonek i ośrodka, które nadmiernie się rozwijają. Ogólnie jednak istnieje pogląd, że to nienormalny rozwój bielma pociąga za sobą osłabienie i obumieranie zarodków. Prawdopodobnie bielmo w początkowym okresie jest tkanką kontrolującą rozwój zarodka, poprzez dostarczanie kompleksowego pożywienia.

Przy użyciu techniki hodowli zarodków Laibach (1925, 1929) otrzymał na pożywce sacharozowej rośliny mieszańcowe z krzyżówki *Linum perenne* × *L. austriacum*, z zarodków wyizolowanych z nieżywotnych, pomarszczonych nasion. Było to pierwszą praktyczną wskazówką że nieżywotność nasion mieszańcowych może być spowodowana nieaktywnością endospermu lub jego niezgodnością z zarodkiem [16, 22, 23]. Była to praca wyjściowa dla wielu skutecznych prób przełamania barier krzyżowalności międzygatunkowej i międzyrodzajowej.

Od tej pory w wyniku hodowli zarodków *in vitro* otrzymano wiele cennych mieszańców z krzyżowań międzygatunkowych w obrębie rodzajów *Datura*, *Zea*, *Trifolium*, *Solanum*, *Phaseolus*, *Oryza*, *Lotus*, *Gossypium*, *Lycopersicon*, *Hordeum*, *Melilotus*, *Fragaria*, *Cerasus* i in [16, 23]. Możliwe było także otrzymanie mieszańców międzyrodzajowych *Hordeum* × *Secale*, *Hordeum* × *Hordelymus*, *Triticum* × *Elymus*, *Triticum* × *Secale*, *Tripsacum* × *Zea* [23], *Hordeum* × *Triticum*, *Hordeum* × *Agropyron* [14].

Hodowla zarodków *in vitro* może być przydatna w każdym programie hodowlanym w ramach którego przeprowadza się krzyżowania mające na celu otrzymanie mieszańców pierwotnych, ponieważ nawet w przypadku, gdy procent zawiązywanych nasion jest dość wysoki, istnieje możliwość stracenia cennych genotypów wyjściowych.

Krzyżowanie pszenicy z żytem jest kontrolowane przez dwa geny kr_1 i kr_2 , umieszczone na chromosomach pszenicy 5B i 5A [28], przy czym ich allele dominujące powodują znaczne obniżenie zdolności krzyżowania, poprzez uszkodzenia wzrostu łagiewki pyłkowej lub powodowanie zakłóceń po zapłodnieniu. Większość odmian pszenic ma te geny w postaci dominującej. Z tego względu krzyżują się one trudno z *Secale cereale*. Rola genomu żytniego we współdziałaniu z genami pszenic nie została jeszcze dokładnie poznana [11]. Najlepiej krzyżują się formy heksaploidalne pszenic z żytem diploidalnym i w zależności od kompozycji

genotypowych osadzanie nasion wynosi 5—51%, średnio 23%, a kiełkowanie nasion średnio 47% [28]. W przypadku krzyżowania pszenic tetraploidalnych osadzanie ziarniaków jest wyższe w kombinacjach z żytem tetraploidalnym i wynosi 0—12%, średnio 6%, zaś kiełkowanie nasion średnio 3,9%. Najmniejszy procent osadzania nasion otrzymano z krzyżowań pszenic diploidalnych z żytem. Wynosił on od 0,04 do 0,09 [Kiss 1968 [cyt. 28]. Wykształcanie się żywotnych ziarniaków podlega olbrzymiej zmienności w zależności od warunków pogodowych. Bywa, że jako efekt bardzo wielu zapyleń otrzymuje się pojedyncze nasiona, szczególnie, gdy krzyżowanie przeprowadza się w warunkach polowych. Pojedyncze nasiona, z których w dodatku nie wszystkie kiełkują, nie mogą stanowić materiału wyjściowego do hodowli. Dodatkowo, część roślin ginie w czasie zabiegów związanych z podwajaniem liczby chromosomów. Pienaar [21] podaje, że w wyniku zapylania 82 genotypów *Triticum durum* siedmioma genotypami *Secale cereale* procent żywotnych ziarniaków wynosił jedynie 0,6% ogółu zapylonych kwiatów. Skuteczność hodowli zarodków wynosiła 5,8%, co podwoiło liczbę otrzymanych roślin mieszańcowych. Skuteczność hodowli zarodków mieszańcowych *T. vulgare* × *S. cereale* wynosiła 55,6%, a *T. sphaerococcum* × *S. cereale* 70%.

W związku z tym wydaje się oczywiste, że izolowanie zarodków i hodowanie ich w sterylnych warunkach mogłoby bardzo wzbogacić i przyspieszyć prace hodowlane.

W 1976 roku w Instytucie Hodowli Roślin i Nasiennictwa AR w Lublinie prowadzono wstępne prace nad możliwościami wykorzystania metodyki kultur *in vitro* zarodków mieszańcowych w programie hodowli *Triticale* [3]. Izolowano zarodki pochodzące z czterech kombinacji krzyżówkowych, w różnych terminach i hodowano je na trzech pożywkach w warunkach sterylnych oraz przy wykorzystaniu techniki *in vivo/in vitro* [14]. Krzyżowanie prowadzono w warunkach polowych, jedynie krzyżówki pszenicy z pszenperzem wykonywano w hali wegetacyjnej. Ilość zarodków branych do hodowli wynosiła w zależności od kombinacji od 1 do 9. Ogółem wyłożono na pożywki 325 zarodków, w tym pochodzących z krzyżowania *Triticum durum* (4x) z *Secale cereale* (2x) — 130 *Triticum aestivum* (6x) z *Triticum turgidum* (4x) — 91, *Triticum timopheevi* (4x) z *Triticale* heksaploidalnym — 79 oraz *Triticum aestivum* (6x) z pszenperzem (6x) — 25. Ponieważ w owocniach pochodzących z krzyżowań pszenicy tetraploidalnej z żytem diploidalnym nie obserwowano zarodków, w tej kombinacji wykładano całe zalążnie i postępowano z nimi jak z zarodkami.

Uzyskane wyniki wstępne (tabela) pozwalają przypuszczać, że hodowla zarodków w warunkach *in vitro* mogłaby być użyteczna dla prowadzonych prac hodowlanych. W kombinacji krzyżówkowej pszenica × żyto, gdzie

Tabela

Wyniki doświadczeń hodowli zarodków mieszańcowych pochodzących z 4 kombinacji krzyżówkowych, izolowanych w 4 różnych terminach, hodowanych na 3 pożywkach wg metody *in vitro* oraz *in vivo/in vitro* [3]

Kombinacja krzyżówkowa	Wiek izo- lowa- nych za- rod- ków (dni po za- pile- niu)	% wykieł- kowań pożywka sacharo- zowa		% wykieł- kowań pożywka Norstoga		% wykieł- kowań pożywka Kruse	
		w gru- pach wie- ko- wych	ogó- łem	w gru- pach wie- ko- wych	ogó- łem	w gru- pach wie- ko- wych	ogó- łem
<i>T. durum</i> 4x (Termidor) ×	6	0		0		0	
<i>S. cereale</i> 2x (Dańkowskie Złote)	9	0		0		0	
	12	0	0	0	0	10	2,17
	15	0		0		0	
% wykiełkowań w metodzie <i>in vivo/in vitro</i>		1,6					
% wykiełkowań w metodzie <i>in vitro</i>		0					
<i>T. aestivum</i> 6x (Kaukaz) ×	6	0		0		0	
<i>T. turgidum</i> 4x (Dinurum)	9	0	22,2	85,7	60,0	33,3	32,5
	12	0		66,6		50,0	
	15	80,0		80,0		80,0	
% wykiełkowań w metodzie <i>in vivo/in vitro</i>		34,2					
% wykiełkowań w metodzie <i>in vitro</i>		44,0					
<i>T. timopheevi</i> 4x ×	6	0		0		0	
Triticale 6x (3 formy)	9	0	11,7	33,3	46,4	25,0	35,2
	12	50,0		80,0		57,7	
	15	50,0		75,0		50,0	
% wykiełkowań w metodzie <i>in vivo/in vitro</i>		30,6					
% wykiełkowań w metodzie <i>in vitro</i>		37,2					
<i>T. aestivum</i> 6x (Zina) ×	9	0		50,0		75,0	
pszenperz 6x	12	0	12,5	100,0	66,6	50,0	61,5
	15	50,0		66,6		50,0	
% wykiełkowań w metodzie <i>in vivo/in vitro</i>		25,0					
% wykiełkowań w metodzie <i>in vitro</i>		69,5					

uzyskano rezultaty negatywne, jak można przypuszczać, zarodki zamierały w bardzo młodym stadium, co mogłyby wykazać badania histologiczne. Być może byłoby skuteczne wykładanie zalążni jeszcze młodszych niż 6-dniowe.

Otrzymywanie roślin haploidalnych przy zastosowaniu hodowli zarodków *in vitro*

Rośliny haploidalne są bardzo atrakcyjnym materiałem badawczym dla genetyków i hodowców. Częstotliwości spontanicznie powstających haploidów są za niskie dla ich praktycznego wykorzystania. W ostatnich kilkunastu latach u takich roślin jak tytoń, *Datura*, *Atropa*, ryż i in. możliwe jest masowe otrzymywanie haploidów w wyniku wywoływania androgenezy w hodowlanych *in vitro* pylnikach i ziarnach pyłku. W przypadku większości roślin zbożowych skuteczność tej metody jest ograniczona występowaniem trudności w różnicowaniu kalusa i powstawaniem dużego procentu roślin albinotycznych. Ostatnio zarysowała się nowa możliwość otrzymywania roślin haploidalnych oparta na zjawisku gynogenezy [5]. Polega ona na krzyżowaniu roślin z zapylaczem którego chromosomy eliminowane są z zygoty we wczesnym stadium. Technika stosowania tej metody, znanej jako „metoda *Bulbosum*” od zapylacza jakim jest *Hordeum bulbosum*, została dokładnie opracowana dla otrzymania haploidów jęczmienia *H. vulgare* i jest stosowana powszechnie na skalę badawczą oraz przez firmy hodowlane w Kanadzie [9].

Nie są dokładnie znane przyczyny eliminacji chromosomów *H. bulbosum* z zygoty mieszańcowej, ale przypuszcza się, że czynniki za to odpowiedzialne znajdują się na chromosomach *H. vulgare*, w liczbie 2—3 [27]. Stwierdzono ponadto, że zjawisko to nie ogranicza się do tej jednej kombinacji krzyżówkowej. Znaleziono już co najmniej 10 kombinacji międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Hordeum*, w wyniku których powstają haploidy, a sposób eliminacji chromosomów jest podobny, jak w przypadku *vulgare* × *bulbosum*, choć czynnik (czynniki) eliminacyjny działa z różną siłą [27]. Ponadto wykazano, że w podobny sposób można otrzymać haploidy *Triticum aestivum* [1]. Po wykonaniu krzyżowań pszenicy Chinese Spring z *Hordeum bulbosum* otrzymano rośliny haploidalne pszenicy, a procent zawiązywanych nasion był zależny od poziomu ploidalności jęczmienia i wynosił 13,7% (2x) i 43,2% (4x). Również w tym przypadku, jak wykazano, zachodziło normalne zapłodnienie, ponieważ w ciągu 6 dni po zapyleniu liczba chromosomów w komórkach zarodka wynosiła 35. Później obserwowano obecność mikrojąder oraz chromosomów opóźnionych i mostów w komórkach mitotycznych, które to zjawiska są dowodem na stopniową eliminację chromosomów.

Pomimo, iż zapłodnienie zachodzi łatwo, a indukcja zygot jest wysoka, endosperm przestaje się rozwijać po kilku dniach, a w następstwie także zarodek. Wówczas konieczna jest jego izolacja i dalsza hodowla na pożywce w warunkach sterylnych. Osadzanie nasion w krzyżówkach *Hordeum vulgare* (2x) × *Hordeum bulbosum* (2x) wynosi około 50%, a skuteczność hodowli zarodków około 11% [12]. Można ją jednak znacznie podwyższyć przez stosowanie wodnego roztworu gibereliny (GA₃) w stężeniu 75 ppm na kwiatki, trzykrotnie po zapyleniu. Gibereлина powoduje wzrost aktywności mitotycznej komórek zarodka i endospermu, a tym samym wzrost objętości endospermu i lepsze zróżnicowanie zarodka do czasu załamania się ich rozwoju [13].

Otrzymywanie roślin w wyniku hodowli *in vitro* zalążni

Dla otrzymywania roślin z niedojrzewających nasion istotne jest wyszczepienie zarodka na pożywkę przed załamaniem się jego rozwoju. Trudność sprawia wówczas izolowanie tak małych tworów, podczas którego zarodki bywają uszkodzane, a ich hodowla na pożywkach staje się nieskuteczna. W takim przypadku możliwa jest hodowla na pożywkach całych zalążni [3, 7, 8, 17]. Dobrze opracowany wydaje się być sposób otrzymywania roślin z krzyżowań pomiędzy rodzajami *Brassica* a *Sinapsis*, *Erucastrum*, *Raphanus* i in. oraz w obrębie rodzaju *Brassica* [7, 8]. Hodowlę owocni próbowano stosować także do otrzymania mieszańców *Gossypium* [17]. Rośliny haploidalne otrzymano w wyniku hodowli *in vitro* zalążni *Hordeum vulgare*, wyszczepianych z kwiatów zawierających pyłek 2- i 3-jądrowy [25].

Ostatnio Nitzsche i Henning [17] donosili o próbach hodowli *in vitro* zalążni traw. Ponieważ dochodziło do zapłodnienia, na co wskazywało nabrzmiewanie zalążni po zapyleniu i późniejsze badania cytoembriologiczne, a próby hodowli zarodków nie były udane, na pożywkę wykładano całe zalążnie. Z wyłożonych 487 rozwinęła się jedna siewka o charakterze mieszańcowym *Lolium perenne* × *Festuca rubra*.

Hodowla całych zalążni najszerzej, bo na skalę produkcyjną, jest wykorzystywana do rozmnażania storczyków. Nasiona storczyków zawierają morfologicznie niezróżnicowane zarodki, odpowiadające stadium globuli. Nie mają one funkcjonalnego endospermu, a okrywa nasienna jest zredukowana do struktury membranowej. W warunkach naturalnych rozwój zarodków i rozmnażanie storczyków jest możliwe dzięki procesowi mikoryzy wewnętrznej, w wyniku której zarodek korzysta z prostych form cukrów, przekształcanych ze skrobi i innych polisacharydów przez grzyby [22]. Do hodowli *in vitro* bierze się całe zalążnie i traktuje je jak zarodki.

Metodyka hodowli zarodków *in vitro* Sterylizacja

Hodowlę zarodków i zajązni *in vitro* należy prowadzić w warunkach całkowicie aseptycznych. W związku z tym konieczne jest odkażanie zarówno materiału roślinnego, jak też pożywek i naczyń oraz wykonywanie prac związanych z wykładaniem na pożywki i przeszczepianiem materiału w warunkach sterylnych.

Szklane naczynia używane do hodowli można, w zależności od warunków laboratoryjnych, odkażać termicznie w suszarce (kilka godzin w temperaturze około 170°C) lub w autoklawie (kilkanaście minut w temperaturze 121°C i ciśnieniu 1 atm). W autoklawie przeprowadza się steryлизację narzędzi używanych do izolacji i przenoszenia zarodków, oraz korków, folii, celofanu i papieru, służących do zakrywania naczyń.

Sterylizacji pożywek dokonuje się w autoklawie, a czas trwania jest uzależniony od objętości pożywki oraz składu chemicznego. W przypadku, gdy do pożywek włączane są substancje termolabilne (niektóre witaminy, hormony wzrostowe i aminokwasy), konieczne jest odkażanie za pomocą filtrowania, przez filtry o średnicy porów 0,45—0,22 mikrona, produkowane w różnych wersjach przez firmy zagraniczne, takie jak Sartorius czy Millipore [26].

Prace związane z wyszczepianiem zarodków powinny być wykonywane w szczelnych kamerach izolacyjnych, wyjałowionych promieniami lamp bakteriobójczych albo w strumieniu sterylnego powietrza, które wytwarzane jest przez mało skomplikowane urządzenie, znane najczęściej pod nazwą „czysty lub sterylny stół”. Działa ona na tej zasadzie, że powietrze napędzane przez dmuchawę przechodzi przez filtry, najczęściej dwa, z których pierwszy oczyszcza je wstępnie, a drugi zatrzymuje wszystkie drobiny o średnicy większej od 0,22 mikrona.

Najwięcej kłopotów i niepowodzeń stwarza problem odkażania materiału roślinnego. Musi być ono powierzchniowe, nie uszkodzające zarodka jest więc nieskuteczne w przypadku przedostania się mikroorganizmów do tkanek zarodka lub endospermu. Szczególną trudność sprawi odkażanie nasion długo pozostających na roślinie lub dłużej przechowywanych. Sterylizacja powierzchniowa polega najczęściej na zanurzaniu lub wytrząsaniu nasion w roztworach wodnych sublimatu rtęciowego (0,1—1,0%), podchlorynów wapnia lub sodu (2—10%), fenolu (5%), alkoholu etylowego (50—96%), antybiotyków (4—50 mg/l), w wodzie chlorowej lub bromowej i końcowym płukaniu wodą sterylną (2, 14, 18, 26, 27, 29). Efektywność sterylizacji można poprawić przez dodanie małej ilości detergenta (0,05%) do roztworu steryliczującego. Detergent powoduje lepsze zwilżenie powierzchni tkanki i umożliwia lepszą penetrację i niszczenie mikroorgani-

zmów. Czas oddziaływania poszczególnych roztworów może wynosić od kilku sekund do kilku godzin. Intensywność sterylizacji zależna jest od stopnia porażenia materiału roślinnego mikroorganizmami oraz grubości okrywy nasiennej. Bardziej zainfekowane są rośliny z upraw polowych. Materiał roślinny pochodzący ze szklarni wystarczy niekiedy tylko płukać wodą sterylną.

Izolowanie zarodków

Izolowanie zarodków, szczególnie bardzo młodych przedstawia dużą trudność dla początkujących. Przeważnie wykonuje się je pod mikroskopem stereoskopowym, przy powiększeniach 10 — 25 ×, używając igły skalpela i pincety. W czasie izolowania należy zwracać uwagę aby zachować warunki sterylne i aby zarodków nie przesuszyć. W tym celu czynności wykonuje się na sterylnej bibule, nasączonej wodą. Ponadto, zarodka nie można uszkodzić ani pozostawić innych tkanek, które mogłyby powodować kalusowanie. Nasiona suche po uprzednim odkażeniu, moczy się w sterylnej wodzie od kilku do kilkudziesięciu godzin. Po wymoczeniu stosuje się często sterylizację powtórna.

Bardzo ważnym czynnikiem jest termin izolowania, szczególnie w przypadku nasion mieszańcowych. Powinien przypadać przed krytycznym momentem załamania się rozwoju zarodka, który zachodzi najczęściej w fazie kształtowania się liścieni. Z drugiej strony należy uwzględnić stadium rozwoju zarodka, bowiem im bardziej jest on zróżnicowany, tym większa skuteczność hodowli. Najczęściej izolacje wykonuje się po upływie 9—18 dni od zapylenia, w zależności od potrzeb, możliwości i wymagań [1, 12, 14, 27].

*Pożywki stosowane w hodowli zarodków *in vitro**

Pożywka jest środowiskiem, w którym powinno być kontynuowane różnicowanie i wzrost wyizolowanego zarodka. Musi spełniać ona rolę funkcjonalnego bielma. Dlatego, oprócz właściwych dla danego stadium rozwojowego zarodka składników pokarmowych, powinna gwarantować odpowiednią kwasowość i ciśnienie osmotyczne.

W zależności od wymagań pokarmowych zarodka można wyróżnić dwie fazy: hetero- i autotroficzną. Gdy zygota zaczyna się dzielić, przekształcając w zarodek, robi to kosztem otaczającego endospermu. Jest to okres wysoce heterotroficzny, wymagający dostarczenia pożywienia kompleksowego, składającego się z aminokwasów, węglowodanów, puryn, pi-

rymidyn, witamin, substancji wzrostowych i innych [22]. Faza autotroficzna zarodka zaczyna się w fazie różnicowania liścieni i powstawania symetrii. Zarodek dysponuje wówczas własnymi enzymami, za pomocą których może przekształcać proste składniki pożywki w ostateczne substraty.

Z powyższego wynika, że nie można mówić o pożywce uniwersalnej dla hodowli zarodków *in vitro*. Pożywka musi być uzależniona od stadium rozwojowego zarodka oraz specyfiki gatunkowej. Zarodki dojrzałe, całkowicie uformowane, wymagają do kiełkowania jedynie podstawowych soli mineralnych i źródła węgla. Zarodki w stadium globularnym mogą kontynuować rozwój jedynie na bielmie naturalnym, które jest bardzo złożoną kompozycją [22], właściwie niemożliwą do odtworzenia w warunkach sztucznych.

Poniżej prezentujemy jedynie najbardziej ogólne wymagania zarodków odnośnie poszczególnych grup składników, wchodzących w skład pożywki.

Składniki mineralne. Dla potrzeb hodowli zarodków opracowano szereg pożywek mineralnych, zawierających wszystkie potrzebne dla metabolizmu roślin pierwiastki, podane w różnych formach i proporcjach. Najczęściej używano pożywek Knopa, Whitea, Nitscha, Hellera, Harrisa, Knudsona, Raghavana i Torreya oraz Randolpha i Coxa [29]. Ostatnio powstało szereg modyfikacji tych składów, z których najbardziej znane są: pożywka G5 Gamborga i wsp. [9], Norstoga [20], Kruse [14], czy Jense- na [9]. Do hodowli zarodków haploidalnych pszenicy używano gotową pożywkę Bacto Difco Orchid Agar [1].

W hodowli zarodków niedojrzałych ważna jest forma w jakiej dostarczany jest azot. Dobrze wykorzystywane są jony amonowe, natomiast azotowe mają często efekt toksyczny [22].

Organiczne składniki azotowe. Składniki te włączane są do pożywek w postaci pojedynczych aminokwasów, mieszanki kompleksów aminokwasów albo produktów degradacji białek, jak kazeina hydrolizowana, albumina mleczna czy ekstrakt drożdżowy. Im zarodek młodszy, tym więcej potrzebuje aminokwasów. Wielokrotnie podkreślano korzystny wpływ kazeiny hydrolizowanej, która oprócz funkcji pokarmowej spełnia rolę regulatora ciśnienia osmotycznego pożywki. Z pojedynczych aminokwasów najczęściej stwierdzono korzystny wpływ glutaminy, kwasu glutaminowego, alaniny, tryptofanu, tyrozyny, fenyloalaniny, cysteiny i leucyny [16, 22].

Węglowodany. Węglowodany w pożywce stanowią źródło węgla oraz regulują ciśnienie osmotyczne. Najlepiej wykorzystywane przez zarodki roślinne są sacharoza i glukoza. Jedynie dla niektórych zarodków storczyków bardziej korzystna jest glukoza, fruktoza czy maltoza [16, 22].

Ilość włączanych do pożywki węglowodanów zależy od stadium rozwojowego zarodka. Im zarodek młodszy, tym większe powinno być stężenie cukrów w pożywce (4—12%), głównie ze względu na wymagane wysokie ciśnienie osmotyczne. Stwierdzono, że wysoki poziom sacharozy zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu zarodków. Zarodki dojrzałe mogą rosnąć i kiełkować na pożywkach zawierających od 0,1—2% sacharozy.

S u b s t a n c j e w z r o s t o w e. Funkcje komórek i organów roślinnych regulowane są obecnością w nich substancji wzrostowych. Cały organizm w warunkach naturalnych wytwarza je sam. W przypadku hodowli organów, tkanek lub komórek w warunkach sztucznych należy je włączać do pożywek w ilościach i rodzajach dostosowanych do celu hodowli. Zarodki bardzo młode wymagają dla wzrostu i różnicowania niewielkich ilości IAA, kinetyny i siarczanu adeniny. Większe ilości auksyny powodują kalusowanie zarodków [16, 21]. Ogólnie można powiedzieć, że obecność auksyn, giberelin, cytokinin czy siarczanu adeniny w pożywce może podwyższać lub obniżać potencjał korzenio- lub i pędotwórczy zarodka, w zależności od jego fazy rozwojowej i wymagań genotypowych oraz rodzaju i wzajemnych proporcji substancji wzrostowych aktywnych biologicznie, włączonych do pożywki.

W i t a m i n y. Najczęściej do pożywek włączana jest tiamina, pirydoksyna i kwas nikotynowy, a także biotyna, ryboflawina, kwas pantotenowy lub pantotenian wapnia, kwas askorbinowy i niacyna oraz zaliczany czasem do kompleksu witamin myo-inositol [9, 14, 20, 22]. Nie można uogólniać efektu poszczególnych witamin w stosunku do różnych gatunków. Konieczne są one w hodowli zarodków niedojrzałych.

N a t u r a l n e e k s t r a k t y r o ś l i n n e. We wcześniejszych badaniach istniała tendencja włączania do pożywek neutralnych ekstraktów roślinnych, takich jak płynny endosperm mleka kokosowego, ekstrakty z kiełkujących lub niedojrzałych nasion zbóż, łubinu, wyciąg z załązni *Datura*, bulw ziemniaka, sok z owoców pomidorów i pomarańczy, czy ekstrakt drożdżowy. Zaobserwowano różną ich skuteczność w hodowli zarodków *in vitro*. Ze wszystkich wymienionych mleko kokosowe ma działanie najbardziej uniwersalne, a jego dodatek (10—20%) jest korzystny dla rozwoju młodych zarodków. Wszystkie naturalne komponenty zawierają różne ilości soli mineralnych, amonokwasów, witamin i substancji wzrostowych, w zależności od pochodzenia i sposobu preparowania. Działają one kompleksowo, a więc w sposób trudny do zdefiniowania. Ze względu na pracochłonność uzyskiwania ekstraktów, trudność zdobycia niedojrzałych orzechów kokosowych, a także różną, nieokreśloną ich wartość biologiczną, jest korzystniej używać tylko komponenty ściśle zdefiniowane i dostępne w handlu. W przypadku hodowli niedojrzałych zarodków mie-

szańcowych, może być pomocny dodatek do pożywki bielma jednego z partnerów, najczęściej matecznego, w postaci wodnego ekstraktu, czasem dializowanego lub też zastosowanie techniki *in vivo/in vitro* [14]. Polega ona na tym, że na powierzchni pożywki hodowlanej, zawierającej sole mineralne, sacharozę, aminokwasy i witaminy wyklada się sterylnie wyizolowane endospermy formy matecznej z usuniętym ich własnym zarodkiem, na miejsce którego wszczepia się zarodek mieszańcowy. Sposób ten był zastosowany do otrzymywania roślin mieszańcowych z krzyżowań pomiędzy *Hordeum* a *Secale*, *Triticum* i *Agropyron*, z zarodków bardzo małych $\leq 0,2$ mm.

A g a r. Do hodowli zarodków używane są pożywki płynne lub zestalone agarem. Hodowla w pożywkach płynnych wymaga stosowania rotorów, wytrząsaczy albo innych urządzeń umożliwiających napowietrzanie kultur. Agar do pożywek stałych używany jest zazwyczaj w ilości 6—12 g/l, w zależności od stopnia oczyszczenia. Okazało się, że agar może obniżać skuteczność hodowli, ze względu na obecność niezidentyfikowanych substancji toksycznych, które można usunąć przez wytrząsanie zawiesiny wodnej agaru z węglem aktywnym [6].

Hodowlę zarodków na pożywkach płynnych można prowadzić także na mostach z bibuły filtracyjnej lub według metody opisanej przez Jense na [9], na pływającym po powierzchni pożywki krążku filtrowym o średnicy porów 0,22 mikrona.

Ogólnie zarodki młode korzystniej jest prowadzić w kulturach płynnych, a w fazie kiełkowania przenosić na pożywki agarowe dla lepszego wzrostu pędów i korzeni [7, 9].

O d c z y n p o ż y w k i. Odczyn pożywki ustawiany jest najczęściej przed dodaniem agaru i przed sterylizacją za pomocą 0,1N NaOH lub HCl. pH aktualnie stosowanych w hodowli zarodków pożywek wynosi od 4,9—6,5 [2, 9, 14, 20]. Van Overbeek i wsp. [1944 cyt. 22] stwierdzili, że dla wczesnych stadiów zarodków *Datura* lepszy był odczyn zbliżony do neutralnego, dla późniejszych korzystniejszy był odczyn bardziej kwaśny. Norstog [20] dla młodych zarodków jęczmienia zaleca pożywkę o pH 4,9. Odczyn endospermu używanego w skutecznej dla młodych zarodków mieszańcowych zbóż metodzie *in vivo/in vitro* wynosił 7,1—7,2, a pożywki 5,9 [14].

Światło i temperatura hodowli zarodków in vitro

Według Narayanaswamy i Norstoga [16] większość zarodków rośnie dobrze w temperaturach 25—30°C, a światło nie wydaje się być czynnikiem istotnie wpływającym na skuteczność hodowli. Optymalna wartość

temperatury zależy jednak od wymagań gatunkowych roślin. Np. zarodki zbóż i ziemniaków rosną najlepiej w temperaturach 18—20°C, a bawełny i storczyków w 32—34°C [2, 9, 16, 22].

Zarodki niedojrzałe wymagają raczej hodowli w ciemności, ponieważ światło może indukować przedwczesne kiełkowanie [9]. Zarodki dobrze zróżnicowane mogą być, a zarodki kiełkujące powinny być hodowane na świetle, o odpowiednim dla wymagań genotypowych fotoperiodzie. Efektywność wzrostu kiełkujących zarodków może być zależna od intensywności i jakości światła.

Podsumowanie

Hodowla zarodków roślinnych *in vitro* jest metodą znaną od dawna. Obecnie znajduje coraz nowe zastosowanie w naukach praktycznych, głównie hodowli, gdzie jest pomocna w otrzymywaniu cennych genetycznie roślin mieszańcowych z nieżywotnych nasion. Nieżywotność nasion może być spowodowana zakłóceniami powstającymi w wyniku krzyżowania form oddalonych genetycznie lub warunkami pogodowymi. Ostatnio metoda hodowli zarodków pozwala na masowe otrzymywanie roślin haploidalnych z krzyżowań międzygatunkowych.

W przypadku nasion długo kiełkujących hodowla zarodków *in vitro* pozwala na skrócenie okresu ich kiełkowania a przez to przyspieszenie cyklu hodowlanego.

Możliwość wykorzystania tej metody jest ograniczona przez małą skuteczność hodowli prazarodków i zarodków niedojrzałych młodych oraz niemożliwość ustalenia uniwersalnej pożywki.

Ponadto, konieczne jest posiadanie specjalnie wyposażonego laboratorium, które nie zawsze może być dostępne w zakładach hodowlanych pracujących metodami tradycyjnymi.

Pomimo tych oczywistych trudności w wielu przypadkach metoda ta jest pomocna w rozszerzaniu bazy genetycznej materiału hodowlanego i stanowi zaczątek sukcesu hodowlanego.

LITERATURA

1. Barclay I.R.: Nature 256, 410—411, 1975.
2. Cameron-Mills V., Duffus C.M.: Ann. Bot. 41, 1117—1127, 1977.
3. Chrzastek M.: Hodowla *in vitro* zarodków mieszańcowych rodzaju *Triticum* i *Secale*, Praca magisterska, Akademia Rolnicza w Lublinie, 1977.
4. Dure III L.S.: Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 259—278, 1975.
5. De Fossard R.A., Ed. Kasha K.J.: Haploids in Higher Plants, 403—410, 1974.

6. Forche E., Neumann K.-H.: Z. Pflanzenzüchtung 79, 250—255, 1977.
7. Harberd D.J.: Euphytica 18, 425—429, 1969.
8. Harberd D.J.: Euphytica 20, 138, 1971.
9. Jensen C.J.: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Ed. Reinert J. Bajaj Y.P.S., 299—330, 1977.
10. Kaltsikes P.J.: Can. J. Bot. 51, 2291—2300, 1973.
11. Kaltsikes P.J.: Z. Pflanzenzüchtg. 71, 264—286, 1974.
12. Kasha K.J., Kao K.N.: Nature 225, 310—312, 1970.
13. Kasha K.J., Subrahmanyam N.C., Ali A.: Theor. Appl. Genet. 51, 169—175, 1978.
14. Kruse A.: Hereditas 77, 219—224, 1974.
15. Modilewski J.S., Oksijuk P.F., Hudiak M.I.: Citoembriologia osnovnykh chliebnykh zlakow, 74—104, 1958.
16. Narayanaswami S., Norstog K.: Bot. Rev. 30, 587—627, 1964.
17. Nitzsche W., Hennig L.: Z. Pflanzenzüchtg. 77, 80—82, 1976.
18. Norstog K.: Amer. J. Bot. 52, 538—546, 1965.
19. Norstog K.: Illinois State Academy Sci. 62, 312—315, 1969.
20. Norstog K.: *In Vitro*. 8, 307—308, 1973.
21. Pienaar R.: Proc. Fourth Intern. Wheat Genetics Symp. 253—258, 1973.
22. Raghavan V.: Biol. Rev. 41, 1—58, 1966.
23. Raghavan V.: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, Ed. Reinert J., Bajaj Y.P.S., 375—397, 1977.
24. Rodkiewicz B.: Embriologia roślin kwiatowych, 207—241, 1973.
25. San Noeum L.H.: Ann. Amelior Plantes 26, 751—754, 1976.
26. Street H.E.: Plant Tissue and Cell Culture, Ed. Street H.E. 11—30, 1973.
27. Subrahmanyam C.N.: Theor. Appl. Genet. 49, 209—217, 1977.
28. Tarkowski C.: *Triticale*: cytogenetyka, hodowla i uprawa, Roczniki Nauk Rolniczych, S.D., 157, 1975.
29. Zdrujkowska-Richter A.I.: Kultura izolowanych zarodyszej i niektoryje drugije prijemy wyraszcziwania rastienij *in vitro*, Moskwa, 1974.