



Wykorzystanie metod współczesnej analizy materiału roślinnego w badaniach somatycznej embriogenezy *Gentiana kurroo* (Royle)

Agnieszka Fiuk, Jan J. Rybczyński

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,
Polska Akademia Nauk, Warszawa

Application of modern methods for plant material studies of *Gentiana kurroo* (Royle) somatic embryogenesis

Summary

Nowadays somatic embryogenesis is being investigated with special attention paid to the identification of genes directly involved in triggering of cell competence and development of ontogenic stages. In order to trace successive cell divisions that lead to the formation of the globular structures, modern scanning and electron microscopy methods are applied. Plantlets, which come from somatic embryogenesis process, should be exactly the same as mother plants but *in vitro* culture conditions may induce many disturbances, which could be lasting (hereditary) or only transitory. These changes are usually called somaclonal variation and could be observed on different levels of the plant organization. To investigate this kind of variations both of the genetic and epigenetic types, specially designed molecular systems are needed. Here, we describe induction of somatic embryos from several explants of *G. kurroo*. In order to evaluate the particular ontogenic stages of somatic embryos and variability of regenerated plants, following methods were applied: light microscopy, scanning and transmission electron microscopy, 2D protein electrophoresis, flow cytometry of DNA content in the cell nucleus, cytogenetic analysis of chromosome number and molecular analysis with the use of AFLP.

Adres do korespondencji

Agnieszka Fiuk,
Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania
Różnorodności Biologicznej,
Polska Akademia Nauk,
02-973 Warszawa.

biotechnologia

4 (75) 95–106 2006

Key words:

Gentiana kurroo, somatic embryogenesis, methods of plant material analysis.

1. Wstęp

Somatyczna embriogeneza jest zjawiskiem unikatowym w świecie organizmów żywych. Dotychczas udało się ją zaindukować na różnego rodzaju eksplanatach, zarówno roślin jedno- jak i dwuliściennych. Jednakże mimo blisko pięćdziesiąt lat od odkrycia somatycznej embriogenezy wciąż zadajemy sobie liczne pytania dotyczące mechanizmów jej sterowania. Przybliżenie wiedzy na ten temat możliwe jest dzięki badaniom, w których wykorzystuje się różnorodne, nowoczesne metody analizy materiału roślinnego. Badania takie ułatwia opracowanie wydajnego i powtarzalnego systemu uzyskiwania zarodków somatycznych dla poszczególnych gatunków roślin.

2. Somatyczna embriogeneza goryczek

U roślin nie tylko zygota może dać początek całemu organizmowi. Według teorii komórkowej mówiącej o totipotencjalnych właściwościach komórek roślinnych, w odpowiednich warunkach, informacja genetyczna w nich zakodowana, może zostać uruchomiona i doprowadzić do odtworzenia całego organizmu (1). Ujawnienie się pełnej totipotencji następuje na drodze organogenezy lub somatycznej embriogenezy. Oba te procesy mogą zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio przez stadium tkanki kalusowej, a także komórkowej kultury zawiesinowej. Ich efektywność zależy od wielu czynników biologicznych, chemicznych i fizycznych. Można tu wymienić m.in. genotyp i stadium rozwojowe materiału roślinnego, z którego pobierany jest eksplantat, skład mineralny pożywki, dodawane do pożywki regulatory wzrostu i kompleksowe składniki organiczne oraz zbalansowanie ich stężeń, stężenie osmotyczne pożywki, natężenie światła i długość jego fali (2).

Dotychczas na drodze organogenezy opracowano metodę rozmnażania trzynastu gatunków i mieszańców goryczek, do których należą: *G. acaulis*, *G. lutea*, *G. purpurea*, *G. cruciata* (3), *G. cerina*, *G. corymbifera* (4), *G. kurroo* (5), *G. punctata* (6), *G. tibetica* (7) *G. scabra* var. *buergeri* (8), *G. pneumonanthe* (9), *G. triflora* (10) i *G. triflora* x *G. scabra* (11). Wydajność tego procesu nie była jednak wysoka. Otrzymywano średnio od 2 do 20 pędów w kulturze agarowej.

U niewielu gatunków goryczek zaindukowano rozmnażanie drogą somatycznej embriogenezy. Pierwsze doniesienie pochodzi z 1994 r. (12). Autor obserwował powstawanie zarodków somatycznych w kulturach zawiesinowych *G. triflora* zaindukowanych z kalusa otrzymanego na elementach kwiatów. Zawiesina komórkowa była namnażana na pożywce zawierającej 1,0 mg/l 2,4-D i 0,1 mg/l BAP. Po przeniesieniu tkanki na pożywkę pozbawioną hormonów wzrostu lub z niskim stężeniem cytokininy następował rozwój zarodków. Konwersja przebiegała w obecności 1,0 mg/l GA₃.

Szczegółowego opisu somatycznej embriogenezy goryczek w kulturach płynnych dokonała Mikuła i wsp. (13). Autorzy obserwowali powstawanie zarodków somatycznych z pojedynczych komórek masy proembriogenicznej (PEM). Komórki te charakte-

ryzowały się obecnością dużego, centralnie położonego jądra, małych wakuoli, licznych mitochondriów, diktiosomów i szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Dodatkowo w amyloplastach następowało gromadzenie się dużych ilości skrobi. Wszystkie wymienione cechy świadczyły o embriogenicznym charakterze komórek. Ich podziały prowadziły do powstania dwu- i trzykomórkowych, wyraźnie odseparowanych struktur, z których kolejno następowało formowanie się zarodków globularnych.

Proces somatycznej embriogenezy został również dokładnie prześledzony w kulturze eksplantatów pierwotnych hipokotyli *G. cruciata* (14) i liści *G. pneumonanthe* (15). W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że embriogeniczna tkanka kalusowa powstaje w wyniku odróżnicowywania komórek perycyklu hipokotyli siewek. Zarodki somatyczne tworzyły się masowo z zewnętrznych, merystematycznych komórek tej tkanki. Wykazano także liczne zaburzenia podczas podziałów komórek epidermy i kory pierwotnej, które w rezultacie prowadziły do ich degradacji. Formowanie się zarodków somatycznych również na eksplantatach liści poprzedzone było powstawaniem tkanki kalusowej. Embriogeniczny kalus tworzył się tutaj z komórek otaczających wiązki przewodzące (16).

Wydajność somatycznej embriogenezy eksplantatów pierwotnych zależała od ich rodzaju, zastosowanych regulatorów wzrostu i badanego gatunku. W kulturach *G. pneumonanthe* otrzymywano odpowiednio 28 i 37 zarodków somatycznych na jednym eksplantacie liścia i merystemu wierzchołkowego (16). Proces ten zachodził w obecności picloramu lub 2,4-D i BAP. Procent eksplantatów formujących embriogeniczny kalus zależał od czasu inkubacji w ciemności, natomiast nie zależał od rodzaju eksplantatu. Mikuła i Rybczyński (17) indukowali somatyczną embriogenezę na liścieniach, hipokotylach i korzeniach siewek trzech gatunków goryczek. Najlepszym eksplantatem okazał się hipokotyl, na którym otrzymano odpowiednio 46, 111 i 71 zarodków dla *G. cruciata*, *G. tibetica* i *G. pannonica*.

Zawiesiny komórkowe stanowiły znacznie wydajniejsze źródło zarodków somatycznych. Eksperymenty przeprowadzono dla trzech gatunków goryczek: *G. pannonica* (18), *G. cruciata* i *G. tibetica* (19). Embriogeniczność tkanki podtrzymywano na pożywce zawierającej 1,0 mg/l dicamby; 0,1 mg/l NAA; 2,0 mg/l BAP i 80,0 mg/l siarczanu adeniny. Po przeniesieniu 100 mg tkanki zawiesinowej na pożywkę zawierającą 80,0 mg/l siarczanu adeniny; 1,0 mg/l kinetyny i 0,5 mg/l GA₃ otrzymywano średnio 570 zarodków somatycznych dla *G. pannonica*, 634 zarodki dla *G. tibetica* i 257 zarodków dla *G. cruciata*. Liczba zarodków somatycznych zależała od wielkości agregatów komórkowych i była najwyższa dla frakcji > 450 μm i 240-400 μm (20).

3. Somatyczna embriogeneza u *G. kurroo*

Pośród przebadanych do tej pory gatunków goryczek (16,17,20), *G. kurroo* wykazywała najwyższe zdolności embriogeniczne. W badaniach wykorzystano różnego typu eksplantaty wielokomórkowe takie jak: liście, elementy siewek (korzeń, hipoko-

tyl, liścienie) i zawiesiny komórkowe oraz jednokomórkowe, które stanowiły protoplasty (21).

W kulturach eksplantatów liści zastosowano 3 różne auksyny: 2,4-D, NAA i dicambę oraz 5 cytokinin: zeatynę, TDZ, CPPU, BAP i kinetynę. Razem przebadano 189 kombinacji hormonów. Spośród zastosowanych auksyn, NAA i dicamba najintensywniej indukowały somatyczną embriogenezę zwłaszcza w obecności BAP. Dodatkowo NAA i 2,4-D silnie stymulowały ryzogenezę, podczas gdy na pożywkach zawierających dicambę nie obserwowano powstawania korzeni. Wydajność somatycznej embriogenezy, wyrażona liczbą eksplantatów tworzących jeden lub więcej zarodków somatycznych była najwyższa w obecności pożywki zawierającej 0,5 mg/l dicamby oraz 1,0 mg/l zeatyny i wynosiła 54,7%. Zadowalające wyniki uzyskano również, gdy zamiast zeatyny zastosowano BAP, wydajność somatycznej embriogenezy wynosiła wówczas 45,9-48,0%. Najwyższą liczbę zarodków somatycznych na jednym eksplantacie liścia, w liczbie około 19 sztuk, odnotowano w obecności dicamby i zeatyny. Na tle innych gatunków goryczek i eksplantatów jest to przeciętny wynik, jednakże w przypadku *G. kurroo*, również na wyrastających z eksplantatu korzeniach przybyszowych obserwowano tworzenie się zarodków somatycznych. Jest to zjawisko niezwykle interesujące z punktu widzenia dalszych badań, tym bardziej, że – jak się wydaje – zarodki somatyczne tworzone były w tym przypadku z pojedynczych komórek ryzodermy.

Innego rodzaju eksplantaty stanowiły liścienie, hipokotyle i korzenie siewek. Indukcję procesu somatycznej embriogenezy obserwowano tutaj bezpośrednio na pożywce zawierającej 0,5 mg/l 2,4-D i 1,0 mg/l kinetyny. Na eksplantatach najpierw pojawiał się kalus, a powstawanie zarodków było reakcją wtórną. Pojedyncze eksplantaty z zarodkami somatycznymi w różnych stadiach rozwojowych od globularnego po liścieniowe przenoszono na pożywkę do konwersji. Liczba zarodków po trzydziestu dniach kultury była dużo wyższa niż na eksplantatach liściowych i wynosiła od 78 na jednym korzeniu do około 160. w przeliczeniu na jeden liścień.

Z zaindukowanej na eksplantatach siewek tkanki kalusowej wyprowadzono zawiesiny komórkowe: liścieniową (K/L), hipokotylową (K/H) i korzeniową (K/K). Po dwóch miesiącach od założenia zawiesin oceniane były ich zdolności morfogenetyczne. Na ilość otrzymanych ze 100 mg tkanki zarodków somatycznych miały wpływ: pochodzenie zawiesiny, wielkość frakcji oraz stężenie stosowanych hormonów. Z zawiesiny pochodzenia liścieniowego, frakcji agregatów komórkowych wielkości $>500 \mu\text{m}$ otrzymano ponad 800 zarodków. Wykazano statystycznie istotny wpływ stężeń badanych regulatorów wzrostu, jak również istotne ich współdziałanie. Wraz ze wzrostem stężenia kinetyny przy braku lub niewielkim stężeniu GA_3 obserwowano wzrost liczby tworzonych zarodków somatycznych, natomiast podwyższanie stężenia GA_3 stopniowo zmniejszało ich liczbę. Dodatkowo obserwowano obniżenie intensyfikacji procesu somatycznej embriogenezy wraz ze zmniejszaniem się wielkości agregatów komórkowych.

Zarodki somatyczne *G. kurroo* otrzymywano również w kulturach protoplastów izolowanych z embriogenicznych zawiesin komórkowych. Wydajność somatycznej

embriogenezy w tego typu kulturach nie przewyższała zdolności morfogenetycznych samych zawieszin, ale okazało się, że możliwe jest tutaj uzyskanie regeneracji drogą bezpośrednią z pojedynczego protoplastu, jeśli tylko źródło protoplastów stanowią młode 3-6-miesięczne zawiesziny. Na podstawie przeprowadzonej analizy trójczynnikowej wykonanej na podstawie oceny podziałów komórkowych liczonych w siódmym dniu kultury, wykazano wysokie istotne różnice w interakcji pomiędzy badanymi typami kultury, wielkością agregatów komórkowych i rodzajem pożywki. Przy najlepszych kombinacjach wymienionych czynników uzyskano średnio 63,3 zarodki somatyczne w kulturze protoplastów K/L i 48,9 w kulturze protoplastów K/H z jednej 100 μ l kropli pożywki zestalonej agarozą.

Somatyczna embriogeneza w kulturach *G. kurroo* jest główną drogą na której ujawniają się zdolności morfogenetyczne tego gatunku. Jej wydajność, podobnie jak u innych goryczek, jest zależna od szeregu czynników. Najwydajniejsze źródło zarodków somatycznych *G. kurroo* stanowi kultura zawieszinowa. Daje ona również możliwość dokładnego prześledzenia omawianego procesu w tym samym czasie, ze względu na obecność zarówno pojedynczych komórek, jak i kilkunasto- czy kilkudziesięciokomórkowych agregatów, w lub z których następuje różnicowanie się zarodków. Pozostałe zastosowane metody kultury okazały się ciekawe ze względu na mało typowe drogi tworzenia się zarodków somatycznych, co umożliwia analizę rozwoju ich kolejnych stadiów ontogenetycznych na ekplantatach pierwotnych lub z pojedynczego protoplastu.

4. Analiza procesu somatycznej embriogenezy *G. kurroo*

Podstawowe narzędzie pozwalające na prześledzenie procesu somatycznej embriogenezy stanowią nowoczesne metody mikroskopii skaningowej i elektronowej. Dzięki specjalnym technikom utrwalania materiału możliwe jest wykonanie ultracienkich preparatów i uzyskanie bardzo dokładnego obrazu zmian zachodzących w komórce podczas nabierania kompetencji (22,23). Na podstawie **analizy ultrastrukturalnej** eksplantatów liści *G. kurroo* implantowanych na pożywkę z różnymi stężeniami auksyn i cytokinin oraz zawieszin komórkowych zobrazowano kolejne etapy rozwoju zarodków somatycznych od pojedynczej komórki do stadium liścieniowego. W zawieszinie komórkowej obserwowano zróżnicowanie w budowie agregatów PEM w zależności od ich wielkości. Frakcja < 150 μ m składała się z pojedynczych komórek oraz drobnych 2-6-komórkowych agregatów, których budowa była jednorodna i wskazywała na embriogeniczny charakter. Agregaty wielkości 150-300 μ m wykazywały większe zróżnicowanie. W zewnętrznych komórkach PEM występowały duże amyloplasty wypełnione ziarnami skrobi, podczas gdy komórki wewnętrzne były dużo mniejsze, ułożone w sposób zwarty, z mniej licznymi ziarnami skrobi, plastydami i licznymi lipidami. Oba wyróżnione typy komórek posiadały gęstą cytoplazmę i aktywne organelle komórkowe. W agregatach komórkowych wielkości powyżej

300 μm obserwowano zróżnicowanie komórek na trzy strefy: 1) zwakuolizowaną (położoną centralnie), 2) skrobiową (środkową), i 3) merystematyczną (zewnętrzną). W centrum znajdowały się duże, starzejące się komórki z rzadką cytoplazmą. W dużych agregatach komórki wewnątrz ulegały lizie powodując ich rozpad. W strefie skrobiowej komórki były mniejsze z charakterystycznymi, licznymi amyloplastami zawierającymi drobniejsze ziarna skrobi. W cytoplazmie występowały drobne wakuole o różnorodnym kształcie oraz duże jądra komórkowe. Najbardziej zewnętrzna strefa komórek wyraźnie oddzielała się od głębiej położonych warstw komórek skrobiowych pogrubionymi ścianami. Sąsiadujące komórki w obrębie tej strefy oddzielone były od siebie cienkimi ścianami i połączone licznymi plazmodesmami. Komórki tej warstwy charakteryzowały się występowaniem gęstej cytoplazmy, szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, dużych jąder komórkowych, licznych mitochondriów, diktiosomów i drobnych wakuol. Mniej licznie, niż w warstwie skrobiowej występowały tu amyloplasty zawierające bardzo drobne ziarna skrobi. W dużych agregatach, w wyniku kolejnych podziałów komórkowych, już w pożywce płynnej dochodziło do formowania się zarodków globularnych po stadium liścieniowe.

W kulturach eksplantatów liści obserwowano jednocześnie tworzenie się korzeni i zarodków somatycznych. Embriogeniczna tkanka kalusowa powstawała przede wszystkim z komórek epidermy i mięksiszu gąbczastego. Dopiero później obserwowano formowanie się struktur globularnych. Zarówno na eksplantatach liści, jak i w zawiesinach komórkowych obserwowano charakterystyczne cechy związane z indukowaniem procesu somatycznej embriogenezy oraz wyglądem komórek totipotencyjnych, tj. izolowanie się komórek grubą ścianą, zanik połączeń plazmodesmowych, intensywne podziały, duże, centralnie położone jądro komórkowe, gęstą cytoplazmę, liczne aktywne organella, drobne wakuole i nagromadzenie skrobi w amyloplastach.

Na podstawie **analizy skaningowej** prześledzono kolejne podziały komórkowe prowadzące do powstania zarodków aż po stadium liścieniowe. Dodatkowo w zawieszinie komórkowej *G. kurroo* obserwowano, że pojedyncze komórki i agregaty odkładają na zewnątrz ścian grubą warstwę substancji białkowo-cukrowych. Podobna reakcja, w postaci otaczania się komórek warstwą kalozy lub kutukuli uważana jest za jeden z markerów embriogeniczności (24).

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzą próby identyfikacji genów oraz kodowanych przez nie białek bezpośrednio związanych z rozwojem poszczególnych stadiów ontogenetycznych zarodka somatycznego i zygotycznego oraz uzyskiwaniem embriogenicznego charakteru przez pojedyncze komórki tkanek roślinnych (25,26). Badania tego typu możliwe są obecnie dzięki istnieniu nowoczesnych technik molekularnych. Dotychczas podobne analizy wykonywano m.in. dla rzodkiewnika (27,28), marchwi (29,30), kakaowca (31) i ogórka (32,33). Dwa pierwsze gatunki uznawane są za rośliny modelowe dla tego typu badań (34). Dotychczas zidentyfikowano kilka genów ulegających ekspresji w warunkach stresowych. Okazało się, że mogą być one jednocześnie związane z procesem odróżnicowania.

wywania i somatyczną embriogenezą. Do tego typu genów należy m.in. wyizolowany w kulturach marchwi SERK (ang. *somatic embryogenesis receptor kinase*), który jest silnie specyficznym markerem aktywacji procesu somatycznej embriogenezy (29).

Doskonałym narzędziem pozwalającym na zobrazowanie zmian ekspresji genów związanych z somatyczną embriogenezą stała się **dwukierunkowa elektroforeza białek**. Metoda ta oparta jest na podwójnym rozdziale materiału w żelach akrylamidowych, przy czym obraz pierwszego rozdziału uzależniony jest od gradientu pH do którego dane białko ma powinowactwo, a drugiego, od jego masy cząsteczkowej. Dotychczas dwukierunkowa elektroforeza białek była częściej wykorzystywana do identyfikacji markerów izoenzymatycznych w hodowli roślin (35-37) oraz badania zmian ekspresji genów podczas rozwoju zarodka zygotycznego (37). Badanie wczesnych etapów embriogenezy było często niemożliwe ze względu na trudności natury technicznej związane z pozyskaniem wyrównanego materiału będącego we wczesnych stadiach rozwoju zarodka. Jednakże dzięki podobieństwom, jakie są obserwowane w rozwoju zarodka zygotycznego i somatycznego możliwe stało się wykorzystanie tych drugich jako alternatywnego źródła materiału do badań. Przypuszczano, że wzór ekspresji będzie podobny dla obu ich typów (38,39), a dodatkową zaletą w przypadku zarodków somatycznych jest możliwość idealnego wyrównania materiału, np. poprzez izolację protoplastów i opracowanie systemu bezpośredniej somatycznej embriogenezy z pojedynczych komórek (40,41). Dwukierunkowa elektroforeza białek może być z powodzeniem stosowana do identyfikacji białek związanych z nabywaniem kompetencji komórek tkanki kalusowej jak i poszczególnymi etapami somatycznej embriogenezy (42-44). Metodę tę zastosowano również w analizie zmian ekspresji genów poszczególnych stadiów rozwoju ontogenetycznego zarodków somatycznych *G. kurroo* izolowanych bezpośrednio z zawiesziny komórkowej. Do analizy białek wybrano siedem stadiów rozwojowych zarodków somatycznych. Rozszerzenie ich spektrum związane było z dużymi różnicami w wielkości stadium liścieniowego. Otrzymane na żelach peptydy miały wielkość od 12 do 70 kDa i lokowały się w przedziale pH wynoszącym od 4 do 10. Wykazano, że 130 peptydów charakterystycznych dla prazarodków nie występuje w stadium liścieniowym. Stadium drugie, tj. w pełni ukształtowany zarodek somatyczny w stadium globularnym, było reprezentowane przez 96 białek charakterystycznych tylko dla tego stadium rozwoju ontogenetycznego. Podobnie w stadium wczesnoliścieniowym określono ich 66. Zarodki w stadiach liścieniowych, różniące się długością liścieni, także wykazywały liczne zmiany. Wydłużanie się liścieni wyzwalalo ekspresję nowych genów, które dotychczas nie były aktywne, bądź hamowało ekspresję tych, które dotychczas jej ulegały. Przeprowadzone eksperymenty mogą posłużyć do dalszych badań związanych z identyfikacją białek i określeniem genów charakterystycznych dla poszczególnych etapów rozwoju zarodków somatycznych.

Uzyskane w wyniku somatycznej embriogenezy regeneraty *G. kurroo* przebadano pod kątem cytometrycznym i molekularnym. Wydawać by się mogło, że rośliny uzyskane na drodze somatycznej embriogenezy będą identyczne jak rośliny mateczne.

Kultury *in vitro* indukują jednak różnorodne zmiany, które powodują zróżnicowanie otrzymanego materiału. W zależności od trwałości powstałych zmian wyróżnia się dwa typy zmienności: genetyczną (dziedziczną), kiedy są one przekazywane na następne pokolenie i epigenetyczną (niedziedziczną), jeśli są one krótkotrwałe.

Poznano wiele czynników mogących wpływać na to, czy i z jaką częstotliwością zmienność jest indukowana. Należą do nich: stopień odejścia eksplantatu od zorganizowanego wzrostu merystematycznego (większa zmienność występuje w tkance kalusowej), wiek eksplantatu, genotyp, poziom ploidalności, warunki kultury takie jak: rodzaj pożywki, wiek kultury, droga regeneracji, częstość pasażu, typ zastosowanej techniki *in vitro* (45). Zmienność indukowana w kulturach *in vitro* dotyczy cech morfologicznych, fizjologicznych, cytologicznych i molekularnych. Rodzaje zmian morfologicznych są bardzo różnorodne i obejmują zarówno cechy jakościowe, jak i ilościowe. Są one związane z mutacjami jednego lub niewielkiej liczby genów (46), a ich ocena nie wymaga skomplikowanych procedur. Najczęściej obserwowanymi zmianami jakościowymi są: przebarwienia liści, zmiana ich kształtu, karłowatość, wybujały wzrost. Do zmian ilościowych zaliczamy: zmiany zawartości suchej masy, długości okresu wegetacji, tolerancji na niekorzystne warunki środowiska, wysokości i pokroju roślin, plonu (47). Zmienność związana z cechami fizjologicznymi dotyczy reakcji na stropy abiotyczne i biotyczne, co powoduje konieczność oszacowania letalnych stężeń czynnika wywołującego stres i wyborem roślin o najwyższej odporności.

Zmienność na poziomie cytogenetycznym związana jest ze zmianami ploidyzacji i zaburzeniami budowy chromosomów tkanek i roślin pochodzących z kultur *in vitro*. Zmiany ploidalności roślin regenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy są zjawiskiem bardzo częstym i mogą być wywoływane na skutek wystąpienia endoreduplikacji lub spontanicznych fuzji protoplastów. Obserwuje się, że w kulturach embriogenicznej tkanki kalusowej zaindukowanej bezpośrednio na eksplantatach pierwotnych, wraz z czasem, następuje akumulacja przemian chromosomowych, zarówno ilościowych jak i strukturalnych, przy jednoczesnym spadku jej zdolności regeneracyjnych (48). Wyprowadzenie embriogenicznych zawieszin komórkowych, a następnie uzyskanie roślin w wyniku kultury ich protoplastów dodatkowo wydłuża czas kultury podczas której tkanka pobudzana jest do wzrostu poprzez obecność auksyn i cytokinin. W licznych pracach udowodniono, że oba te czynniki prowadzą do podwyższenia zmienności zarówno kultur zawieszinowych, jak i kalusowych (49-51). Poziom tych zmian można kontrolować poprzez ocenę liczby chromosomów za pomocą licznych, opracowanych do tej pory metod (52) lub zawartości DNA z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Ta druga metoda opiera się na zastosowaniu odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego, który wiążąc się z DNA umożliwia określenie jego poziomu w jądrze komórkowym badanych roślin (53). Ocena regeneratów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy za pomocą cytometrii przepływowej pozwala zatem na dobór takiego eksplantatu i metody kultury, które gwarantują uzyskanie najbardziej jednorodnego materiału.

Na podstawie **analizy cytometrycznej** regeneratów *G. kurroo* wykazano zmiany zawartości jądrowego DNA w zależności od zastosowanego eksplantatu i systemu regeneracji. Pośród 47 przebadanych roślin zregenerowanych na drodze somatycznej embriogenezy na eksplantatach liści nie zaobserwowano zmian ilości DNA w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Wśród regeneratów uzyskiwanych na eksplantatach siewek goryczek 7 wykazało podwojoną zawartość DNA, przy czym 5 z nich otrzymano w kulturach hipokotyli. Również zawiesina pochodzenia hipokotylowego okazała się bardziej niestabilna od liścieniowej. Zmiany zawartości jądrowego DNA w zawiesinach komórkowych kilku gatunków goryczek obserwowała także Miłkowska (19). Autorka, podobnie jak to miało miejsce w kulturach omawianej pracy, wykazała podwyższenie zawartości DNA w regenerowanych z nich roślinach, wskazując jednocześnie na najwyższą niestabilność w obrębie zawiesiny pochodzenia korzeniowego. Pośród 108 roślin uzyskanych z kultur protoplastowych *G. kurroo*, 29 wykazywało podwojenie, a 3 potrojenie zawartości DNA. Zawartość DNA była skorelowana z liczbą chromosomów. Do ich liczenia zastosowano dwie metody: Feulgena i maceracji enzymatycznej. U regeneratów 2C oraz roślin kontrolnych obserwowano 26 chromosomów, natomiast u regeneratów 4C odpowiednio 52 chromosomy.

Znacznie większej precyzji w ocenie zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* możemy się spodziewać po zastosowaniu markerów molekularnych (54). Najczęściej wykorzystywanymi dotychczas technikami pozwalającymi na ocenę stopnia zróżnicowania badanego materiału na poziomie molekularnym są analizy typu: RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (ang. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) i AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*). RAPD umożliwia losowe powielanie obszarów DNA, zawartych pomiędzy starterami komplementarnymi z obiema niciami matrycowego DNA, których końce 3' są zorientowane ku sobie (55). Często jednak, ze względu na niską specyficzność stosowanych dziesięcionukleotydowych starterów oraz niską temperaturę komplementacji, obserwowany polimorfizm prążków jest niewielki lub nie ujawnia się wcale (56-58). Pozostałe dwie z wymienionych technik wykorzystują polimorfizm DNA uzyskiwany w wyniku trawienia jednym lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi dwuniciowego DNA. RFLP była dotychczas stosowana m.in. do porównania zmienności somaklonalnej regeneratów trzciny cukrowej (59), palmy oleistej (60) i ryżu (61). Jej wadą jest mała przydatność, gdy oczekujemy, że poziom zmienności będzie niski oraz wymagana duża ilość DNA wykorzystywanego do doświadczeń (62). Metoda AFLP opracowana przez Vosy i wsp. (63) łączy cechy dwóch technik – powtarzalność charakterystyczną dla RFLP i wzmacnianie sygnałów wykorzystywanych w reakcji PCR. Poza tym cechuje ją: a) wysoka wydajność generowania polimorficznych fragmentów, b) niski procent błędów (ok. 3%), c) stosunkowo niski koszt, d) niewielkie wymagania co do ilości DNA i e) możliwość wykrycia zmienności na poziomie metylacyjnym (64,65). Procedura AFLP obejmuje kilka etapów. Pierwszym jest izolacja genomowego DNA, które następnie poddawane jest trawieniu dwoma enzymami restrykcyjnymi. Jeżeli celem jest ocena zmienności wzorów metylacji muszą one być izoschizomerami różniącymi

cymi się wrażliwością na ten proces. Do najczęściej stosowanych izoschizomerów należą *MspI* i *HpaII* (66-68). Oceny zmienności sekwencji nukleotydowych można dokonać na przykład za pomocą trawienia parami restryktaz *EcoRI/MseI* lub *PstI/MseI*. Kolejny etap procedury stanowi przyłączenie do powstałych po trawieniu fragmentów restrykcyjnych – adaptorów, a następnie zaprojektowanych na podstawie ich sekwencji nukleotydowych starterów. Startery posiadają dodatkowy nukleotyd na 3' końcu umożliwiając powielenie tylko tych fragmentów DNA (tzw. wstępny PCR), które powstały z trawienia właściwych miejsc restrykcji, specyficznych dla danej restryktazy. W dalszym etapie określanym jako selektywny PCR, w przypadku którego matrycą są produkty wstępnego PCR. Startery użyte do tego PCR posiadają dwa dodatkowe nukleotydy selekcyjne w porównaniu do wstępnego PCR, dzięki czemu możliwa jest selekcja pożądanej liczby fragmentów. Detekcji namnożonych i rozdzielonych fragmentów DNA na żelu poliakrylamidowym dokonuje się za pomocą radioaktywnego P^{32} , którym znakowany jest 5' koniec startera selektywnego.

Za pomocą **analizy molekularnej** dokonano oceny zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* na poziomie sekwencyjnym i metylacyjnym dla regenerantów *G. kurroo* uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy z eksplantatów liści, elementów siewek i zawiesin komórkowych pochodzenia liścieniowego. Zastosowano metodę AFLP. Do trawienia wykorzystano wcześniej nie opisywane dla roślin dwuliściennych izoschizomery *KpnI* i *Acc65I*. Regeneranty przebadano w pięciu układach selektywnych starterów AFLP. Uzyskane profile AFLP pozwoliły na identyfikację prążków selektywnych ilości od 20 do 50 na pojedynczy rozdział, w zależności od rodzaju użytych starterów i pochodzenia regenerantów.

Ogólna zmienność identyfikowana dla regenerantów *G. kurroo* uzyskiwanych w kulturach eksplantatów liści i siewek wynosiła odpowiednio 11 i 18%, natomiast w kulturach zawiesin komórkowych 18,5%. Zmienność na poziomie sekwencyjnym była niższa od zmienności powodowanej metylacją cytozyny.

5. Podsumowanie

Rozmnażanie roślin w warunkach kultur *in vitro* daje możliwość szybkiego uzyskania dużej ilości jednorodnego materiału. Somatyczna embriogeneza jest procesem morfogenetycznym, który stanowi najwydajniejsze źródło zarodków. Jednocześnie unikatowość tego zjawiska, przypisywana tylko roślinom, skłania badaczy do prowadzenia badań mających na celu dokładne poznanie omawianego procesu. Dotychczas opracowane metody dają możliwość prześledzenia rozwoju zarodka somatycznego od pojedynczej komórki, łącznie z identyfikacji genów i białek specyficznych dla poszczególnych stadiów rozwojowych, a także analizy roślin uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Zastosowanie niektórych z nich pozwoliło również na prześledzenie tego procesu u *G. kurroo*.

Literatura

1. Pierik R. L. M., (1987), *In vitro culture of higher plants*, Ed. Nihoff M., the Netherlands, 21-27.
2. Rybczyński J. J., (1991), *Rozprawy Naukowe i Monografie*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 8-13.
3. Momčilović I., Grubišić D., Nešković M., (2001), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Transgenic Crops III*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 48, 123-138.
4. Morgan E. R., Butler R. M., Bicknell R. A., (1997), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25, 1-8.
5. Sharma N., Chandel K. P. S., Paul A., (1993), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34, 307-309.
6. Vinterhalter B., Vinterhalter D., (1998), *Arch. Biol. Sci.*, 50, 177-182.
7. Skrzypczak-Pietraszek E., Skrzypczak L., Wesołowska M., (1993), *Scientia Pharmaceutica*, 62, 287-296.
8. Yamada Y., Shoyama Y., Nishioka I., Kohda H., Namera A., Okamoto T., (1991), *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 204-206.
9. Lemproye A., Crevecoeur M., Kevers C., Gaspar T., (1987), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 52, 1255-1257.
10. Hosokawa K., Nakano M., Oikawa Y., Yamamura S., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 578-581.
11. Hosokawa K., Oikawa Y., Yamamura S., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 747-751.
12. Tabira H., (1994), *International Horticultural Congress*, Kyoto, Japonia, 21-28 VIII 1994.
13. Miłucha A., Rybczyński J. J., Tykarska T., Kuraś M., (2001), *Biol. Biulletin of Poznań*, 38, 47-53.
14. Miłucha A., Tykarska T., Kuraś M., Rybczyński J. J., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 41, 686-694.
15. Pawłowska B., Bach A., (1995), *V Ogólnopolski Zjazd Hodowców Roślin Ogrodniczych*, Skierniewice.
16. Bach A., Pawłowska B., (2003), *L. Acta Bot. Cracov.*, 45/2, 79-86.
17. Miłucha A., Rybczyński J. J., (2001), *Acta Physiol. Plant.*, 23, 15-25.
18. Miłucha A., Skierski J., Rybczyński J., (2002 a), *Acta Physiol. Plant.*, 24, 311-322.
19. Miłucha A., Rybczyński J. J., Skierski J., Latkowska M. J., Fiuk A., (2005 b), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Eds. A. K. Hvoslef, E. W. Preil, 345-356.
20. Miłucha A., Tykarska T., Kuraś M., Iwanowska A., Rybczyński J. J., (1996), *Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants*, Quedlinburg, Germany, 290-295.
21. Fiuk A., (2006), *Zdolności morfogenetyczne wielo- i jednokomórkowych eksplantatów goryczek*, praca doktorska, Biblioteka Ogrodu Botanicznego – CZRB PAN, Powsin.
22. Yeung E., (1995), *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Ed. Thorpe A. T., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 205-247.
23. Kononowicz H., (1992), *Post. Biol. Kom.*, 19, 35-44.
24. Merkle S. A., Parrott W. A., Flinn B. S., (1995), *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Ed. Thorpe A. T., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155-203.
25. Fehér A., Pasternak T. P., Dudits D., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 74, 201-228.
26. Kucharska M., (1994), *Prace Ogrodu Botanicznego PAN*, 5/6, 29-38.
27. Shah K., Russinova E., Gadella W. J., Willemse J., de Vries S. C., (2002), *Gene. Dev.*, 16, 1707-1720.
28. Hecht V., Vielle-Calzada J.-P., Hartog M. M., Schmidt D. L., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 803-816.
29. Schmidt D. L., Guzzo F., Toonen M., de Vries S. C., (1997), *Development*, 124, 2049-2062.
30. Kitamiya E., Suzuki S., Sano T., Nagata T., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 551-557.
31. Santos M., Romano E., Yotoko K. S., Tinoco M. L., Dias B. B., Aragão F. J., (2005), *Plant Sci.*, 168, 723-729.
32. Linkiewicz A., (2001), *Izolacja i analiza genów ulegających indukcji lub represji w początkowych stadiach somatycznej embriogenezy ogórka (Cucumis sativus L.)*, praca doktorska, Biblioteka SGGW, Warszawa.
33. Filipecki M., Sommer H., Malepszy S., (1997), *Plant Sci.*, 125, 63-74.
34. Raghavan V., (2006), *Curr. Sci.*, 10, 1336-1343.
35. Kalinowski A., Wojciechowska B., (2003), *Euphytica*, 133, 201-207.
36. Kalinowski A., Wojciechowska B., (2004), *Acta Physiol. Plant.*, 26, 75-84.
37. Higgins P., Bowles D. J., (1990), *Plant Sci.*, 69, 239-247.
38. Zimmerman J. L., (1993), *Plant Cell.*, 5, 1411-1423.

39. Lin X., Zimmerman J. L., (1999), *J. Exp. Bot.*, 336, 1139-1147.
40. Rybczyński J. J., (1997), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 51, 159-170.
41. Berrios E. F., Gentzmittel L., Mokrani L., Alibert G., Sarrafi A., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 101, 606-612.
42. Sallandrouze A., Faurobert M., Maataoui M., Espagnac H., (1999), *Electroph.*, 20, 1109-1119.
43. Chen L. J., Luthe D. S., (1987), *Plant Sci.*, 48, 181-188.
44. Stirn S., Jacobson H. J., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 50-54.
45. Karp A., (1995), *Euphitica*, 85, 295-302.
46. Peschke V., Phillips R., (1992), *Adv. in Genet.*, 30, 41-75.
47. Larkin P. J., Scowcroft W. R., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
48. Małuszyńska J., (1994), *Prace Ogródu Botanicznego PAN*, 5/6, 19-28.
49. Orlikowska T., (1997), *Regulatory roślinne w kulturach in vitro. Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, red. Jankiewicz L., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 219-248.
50. Kumar P. S., Mathur V. L., (2004), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 78, 267-271.
51. Mukhopadhyay M. J., Sengupta P., Mukhopadhyay S., Sen S., (2005), *Scientia Horticulturae*, 104, 1-9.
52. Małuszyńska J., Olszewska M. J., (1999), *Podstawy cytogenetyki roślin*, red. Olszewska M. J., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 215-222.
53. Ulrich I., Fritz B., Ulrich W., (1988), *Plant Sci.*, 55, 151-158.
54. Cloutier S., Landry B. S., (1994), *In Vitro Cell Molecular Biology Reports*, 30P, 32-39.
55. Chwedorzewska K., (2000), *Analiza zmienności populacji żyta na poziomie molekularnym w aspekcie długotrwałego przechowywania i regeneracji ziarniaków*, praca doktorska, Biblioteka Ogródu Botanicznego – CZRB PAN Powsin.
56. Shoyama Y., Zhu X. X., Nakai R., Shiraishi S., Kohda H., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 450-453.
57. Rani V., Parida A., Raina S. N., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 459-462.
58. Fourré J. L., Berger P., Niquet L., André, (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 159-169.
59. Chowdhury M. K. U., Vasil I. K., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 181-188.
60. Jaligot E., Beulé T., Rival A., (2002), *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1263-1269.
61. Müller E., Brown P. T. H., Hartke S., Lörz H., (1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 153-156.
62. Bednarek P., Chwedorzewska K., (2001), *Biotechnologia*, 1, 9-34.
63. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Rijans M., van de Lee T., Hormes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
64. Vendrame W. A., Kochert G., Wetzstein H. Y., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 853-857.
65. Matthes M., Singh R., Cheah S.-C., Karp A., (2001), *Theor. Appl. Genet.*, 102, 971-979.
66. Peraza-Echeverria S., Herrera-Valencia V., James-Kay A., (2001), *Plant Sci.*, 161, 359-367.
67. Cervera M.-T., Ruiz-Garcia L., Martinez-Zapater J., (2002), *Mol. Genet. Genomics*, 268, 438-445.
68. Raina R., Behera M. C., Chand R., Sharma Y., (2003), *Current Science*, 5, 667-670.