

Somatyczna embriogeneza: od odkrycia przez badania do praktycznego wykorzystania

prof. dr hab. Anna Mikula✉,
dr Karolina Tomiczak,
dr Małgorzata Grzyb,
mgr Wojciech Tomaszewicz

Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie

https://doi.org/10.18388/pb.2021_403

✉ autor korespondujący: a.mikula@obpan.pl

Słowa kluczowe: indukcja embriogenezy, kultury *in vitro*, mikrorozmnażanie, totipotencja, zarodek somatyczny

Wykaz stosowanych skrótów: 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; ABA – kwas abscysynowy; BAP – N⁶-benzylaminopuryna, BBM – gen *BABY BOOM*; IAA – kwas indolilo-3-octowy; *LEC1* – gen *LEAFY COTYLEDON1*; *LEC2* – gen *LEAFY COTYLEDON2*; PEM – masa proembriogeniczna; PGR – roślinny regulator wzrostu; SE – somatyczna embriogeneza

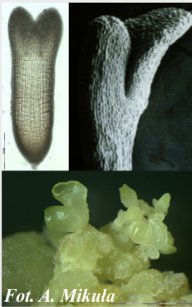



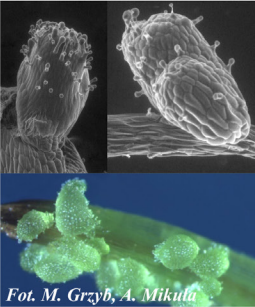
STRESZCZENIE

Komórki roślinne mają niezwykłą zdolność adaptacji do zmian środowiskowych. Jej przejawem jest tworzenie zarodków wprost z komórek ciała rośliny z pominięciem etapu zapłodnienia. Powstałe tą drogą struktury rozwijają się w kompletne rośliny, a sam proces, dla odróżnienia drogi powstawania i podkreślenia spójności z embriogenezą zygoczną, jest określany mianem embriogenezy somatycznej (SE). Mimo, iż w 2018 roku minęło 60 lat od opisanego tego zjawiska po raz pierwszy, to mechanizm przeprogramowania komórki somatycznej w embriogeniczną nadal nie jest w pełni poznany. Jest to krytyczny etap w SE, który może być indukowany egzogennymi substancjami dodawanymi do pożywki oraz oddziaływaniem czynnikami stresowymi. Działanie tych czynników na materiał roślinny wpływa na reorganizację struktury chromatyny, a tym samym na ekspresję genów, co w konsekwencji może uruchamiać program embriogenezy. W niniejszej pracy dokonano przeglądu aktualnej wiedzy na temat tożsamości komórek totipotencjalnych oraz bodźców wymaganych do przeprogramowania rozwoju komórek somatycznych. Podsumowano informacje dotyczące kluczowych molekularnych regulatorów, które kontrolują indukcję SE. Zdefiniowano również zagadnienia, które są ważne dla pełnego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw totipotencji. Na zakończenie pokazano potencjał praktyczny drzemiący w tym procesie i podano przykłady jego wykorzystania.

HISTORIA BADAŃ NAD SOMATYCZNĄ EMBRIOGENEZĄ

Badania nad totipotencją roślin mają swój początek w teorii komórek Schleidena (z 1838 r.) i Schwanna (z 1839 r.), która mówi, że organizmy składają się z pojedynczych komórek mających zdolność do niezależnego wzrostu i podziału. Opierając się na tej teorii, Haberlandt w 1902 roku położył podwaliny pod badania nad totipotencją roślin *in vitro*, przewidując, że zarodki mogą być generowane z komórek hodowanych w warunkach sztucznych [za 1]. Jego koncepcja była oparta na wstępnych eksperymentach i została potwierdzona doświadczalnie dopiero pół wieku później. W tym czasie odkrycie auksyn przez Wentta [2] oraz rozwinięcie z ich użyciem na przełomie lat 1938-1939 ciągłych kultur tkanek kambialnych marchwi (*Daucus carota* L.) i tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) w Paryżu przez Gauthiereta, w Grenoble przez Nobecourta i w Princeton przez Whita [za 1], pozwoliły na przyspieszenie badań nad zdolnościami regeneracyjnymi komórek i tkanek roślinnych w warunkach kultur *in vitro*. Kluczowe w tych badaniach było nabycie umiejętności sterowania procesami regeneracyjnymi za pomocą auksyny. Wykazano, że obniżenie zawartości kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w pożywce prowadzi do powstania roślin dwiema różnymi drogami: przez regenerację korzeni i następnie pędów [3] lub generowanie najpierw pąków, a potem korzeni [4]. Kilka lat później, kiedy to Steward i współpracownicy opisali zdolność segmentów zróżnicowanej wtórnej tkanki łyka marchwi do regeneracji struktur zarodkopodobnych [5], rozpoczęła się historia SE. Mimo, że badacze ci nie uzyskali somatycznych zarodków *per se*, to skupiając się na opisie wczesnych form proembrionalnych i wykazanej totipotencji somatycznych komórek, sformułowali hipotezę, która zdominowała dyskusję i badania nad embriogenezą *in vitro* na szereg kolejnych dekad. Fenomen ich pracy polegał na dostarczeniu idei, którą można było przetestować doświadczalnie. Z tego względu rok 1958 na trwałe wpisał się do podręczników jako rok odkrycia procesu SE. Badania Reinerta opublikowane w 1959 r. dostarczyły niezbitych dowodów powstawanie w warunkach *in vitro* dwubiegunowych struktur, które w dodatku były inicjowane podziałami pojedynczych komórek somatycznych [6]. Cztery lata później trzech niezależnych badaczy zobrazowało rozwój zarodków somatycznych z wykorzystaniem metod mikroskopowych [7-9].

Somatyczna embriogeneza u gatunków reprezentujących różne grupy taksonomiczne była odkrywana stopniowo, a pomiędzy opisaniem tego zjawiska po raz pierwszy u roślin nasiennych i zarodnikowych minęły aż 42 lata (Ryc. 1). Najdłuższej, bo od 1958 r., trwa historia SE roślin dwuliściennych, a pionier-

<i>Spermatophyta</i>			<i>Lycopodiophyta</i>	<i>Monilophyta</i>
dwuliścienne	jednoliścienne	nagonasienne	widlaki	paprocie
				
Fot. A. Mikula	Fot. J. Rybczyński	Fot. M. Łatkowska	Fot. W. Szypuła	Fot. M. Grzyb, A. Mikula
1958	1968	1985	2000	2015
<i>Daucus carota</i> L. (Steward i wsp. 1958; Reinert 1959)	<i>Asparagus officinalis</i> L. (Wilmar, Hellendoorn 1968)	<i>Picea abies</i> Karst. <i>Larix decidua</i> Mill. (Chalupa 1985; Nagmani, Bonga 1985)	<i>Lycopodiella inundata</i> (L.) Holub (Atmane i wsp. 2000)	<i>Cyathea delgadii</i> Sternb. (Mikuła i wsp. 2015)

Rycina 1. Historia odkryć somatycznej embriogenezy u roślin naczyniowych (*Tracheophyta*)

ską rośliną jest marchew. Wśród roślin jednoliściennych proces ten po raz pierwszy udokumentowano w 1968 r. u szparaga lekarskiego (*Asparagus officinalis* L.) [10], zaś u (należących do tej grupy) roślin zbożowych nastąpiło to dopiero w 1980 r. i dotyczyło: rozplenicy amerykańskiej (*Pennisetum americanum* L.), sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) i życicy wielkokwiatowej (*Lolium multiflorum* Lam.) [11]. Badania prowadzone z wykorzystaniem roślin jednoliściennych jednoznacznie pokazały znaczenie eksplantatów w sukcesie indukowania zarodków somatycznych, w tym wpływ dojrzałości materiału wyjściowego oraz sposób jego ułożenia na pożywce. W zaindukowaniu SE u roślin nagonasiennych kluczową rolę odegrał ośrodek w Kanadzie kierowany przez prof. Don J. Durzana, w którym od lat 60. XX wieku prowadzono badania nad metabolizmem komórek różnych gatunków drzew iglastych [12]. W 1985 r. Chalupa [13] uzyskał zarodki somatyczne świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) H. Karst). W tym samym roku Nagmani i Bonga [14] zainicjowali kalus embriogeniczny z megagametofitów modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) oraz uzyskali zarodki somatyczne i zregenerowali rośliny. Pilna potrzeba produkcji drzew iglastych na dużą skalę i profity, jakie daje ten proces w selekcji roślin o ulepszonych cechach, doprowadziły w krótkim czasie do pojawienia się szerokiej oferty protokołów regeneracyjnych dla różnych gatunków sosen, w tym: *Pinus taeda* L., *P. strobus* L., *P. sylvestris* L., *P. pinaster* Aiton, *P. radiata* D. Don, *P. patula* Schiede ex Schltdl. & Cham., daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco), jodły kaukaskiej (*Abies nordmanniana* (Steven) Spach), świerków: *Picea glauca* (Moench) Voss, *P. abies* i *P. mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb. oraz szeregu mieszańców modrzewia (*Larix* Mill.). Namacalnym dowodem na znaczenie tej technologii dla rozmnażania klonalnego drzew iglastych było opublikowanie w latach 2000-2016 około 40 artykułów na temat SE u nowych gatunków z tej grupy roślin [15]. Na tle tych osiągnięć badania nad embri-

ogenezą roślin zarodnikowych wypadają nadzwyczaj słabo. Pierwsza praca przedstawiająca kompleksową regenerację widłaczka torfowego (*Lycopodiella inundata* (L.) Holub.) pojawiła się dopiero w 2000 r. [16]. Zawiera ona dokumentację mikroskopową obrazującą wygląd tkanki kalusowej i opisuje inicjację i rozwój zarodków somatycznych. W obrębie kladu *Lycopodiophyta* 5 lat później opisano jeszcze regenerację wrońca widlastego (*Huperzia selago* L.) [17]. Praca była jednak bardziej nakierowana na analizę substancji czynnej huperzyny A, niż na opisywanie detali procesu embriogenezy. *Monilophyta* to ostatnia grupa roślin na drzewie filogenetycznym, u której opisanie SE w 2015 r. zamyka listę odkryć w obrębie poszczególnych kladów *Tracheophyta* [18].

Powszechnie wiadomo, że pomyślne zakończenie embriogenezy jest podstawą produkcji nasion i owoców. Wydajność rolnicza i ogrodnicza opiera się w dużej mierze na kontroli procesów zapylenia, zapłodnienia, embriogenezy, tworzenia nasion i rozwoju owoców. Nie jest więc zaskoczeniem, że tak wiele uwagi poświęcono indukcji i opisywaniu SE u gatunków roślin nasiennych. W ciągu pierwszych 20 lat od odkrycia tego procesu został on zaindukowany u 132 gatunków należących do 81 rodzajów i 32 rodzin [19]. W kolejnym podsumowaniu opracowanym 16 lat później (w 1995 r.) znajdujemy już znacznie liczniejsze zestawienie przedstawiające spisy: 180 gatunków zielnych roślin dwuliściennych, 120 gatunków roślin jednoliściennych i prawie 160 gatunków roślin drzewiastych [20]. Po 1995 roku, prawdopodobnie z powodu lawinowego wzrostu publikacji, nikt więcej nie podjął się dokonania takiego ilościowego zestawienia. Z łatwością można jednak policzyć, że do 2021 roku proces SE udokumentowano jedynie dla 3 gatunków roślin zarodnikowych, wśród których znajdują się 2 gatunki z kladu *Lycopodiophyta* [16,17] i 1 gatunek z kladu *Monilophyta* – paproć drzewiasta *Cyathea delgadii* Sternb. [18]. To wskazuje, że chociaż rośliny zarodnikowe są ważnym elementem

różnorodności biologicznej, to jednak wartość użytkowa jest tym parametrem, który w największym stopniu kształtuje naukowe zainteresowania.

WYZWANIA W ODKRYWANIU PROCESU SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Embriogeneza zygotyczna i somatyczna stanowią równoległe programy rozwojowe roślin, w których komórki nabywają embriogeniczną kompetencję i rozwijają się w zarodki. W przypadku pierwszego programu zapłodniona komórka jajowa przechodzi serię zdarzeń różnicujących i prowadzących do powstania dojrzałego zarodka, który jest najczęściej zatrzymany w rozwoju, metabolicznie wyciszony i zamknięty w nasieniu. W drugim typie embriogenezy komórki somatyczne zmusza się do zmiany ich przeznaczenia i przekształcania się w zarodki, których rozwój jest zwykle tożsamy z ontogenezą zarodka zygotycznego [21]. Podobieństwa sprawiają, że dla obu procesów wspólne są czynniki kontroli hormonalnej, transkrypcyjnej, rozwojowej i epigenetycznej [21,22]. Ponadto możliwość sterowania procesem w warunkach *in vitro* oraz brak okrywy nasiennej sprawiają, że SE (będąc łatwiejszą do obserwowania) jest chętnie wykorzystywana do poznawania morfologii oraz opisywania biochemicznych, genetycznych i molekularnych mechanizmów indukcji i rozwoju zarodka [23].

Największym wyzwaniem dla badaczy zajmujących się SE jest odkrycie jak pojedyncza komórka staje się kompletną rośliną. Dla uzyskania odpowiedzi na to pytanie, postawione w 2005 roku na łamach specjalnego zeszytu „Science” [24], dwa zagadnienia są obecnie szczególnie intensywnie badane. Dotyczą one wczesnego etapu tego procesu, tj. 1) indukcji SE i 2) formowania osi apikalno-bazalnej struktury zarodkowej. Najwcześniejszym zdarzeniem rozpoczynającym indukcję SE jest ustanowienie kompetencji embriogenicznej. Dochodzi do niego przed pierwszym podziałem komórki somatycznej. Etap ten jest trudny do uchwycenia, badania i porównywania między różnymi systemami roślinnymi. Wpływa na to zróżnicowany status fizjologiczny tkanek inicjalnych [25], konieczność stosowania różnych czynników do wywoływania SE, odmienny przebieg SE (bezpośredni lub pośredni – poprzez tkankę kalusową) oraz różne drogi powstawania zarodków somatycznych (z pojedynczej komórki lub z wielu komórek). Kolejnym nurtującym zagadnieniem jest formowanie się osi apikalno-bazalnej. Podczas gdy u zwierząt wyższych dojrzały zarodek jest miniaturą dorosłego zwierzęcia, a wszelkie zmiany zachodzące podczas rozwoju postembrionalnego zachodzą w granicach organizacji organizmu ustalonego podczas embriogenezy, to u roślin wyższych embriogeneza prowadzi do powstania formy młodocianej – siewki, której brakuje większości cech gatunkowych rośliny dorosłej. Merystem pędu pierwotnego na górnym końcu (apikalnym) jest źródłem komórek dla nowych organów (liści, merystemów pędów bocznych, kwiatów). Merystem pierwotny korzenia na dolnym końcu (bazalnym) wytwarza komórki dla przedłużenia wzrostu korzenia pierwotnego. Kształtowanie złożoności architektonicznej roślin podczas rozwoju postembrionalnego jest uwarunkowane podstawową organizacją ciała ustanowioną w czasie embriogenezy. Ciągłe jeszcze niewiele wiadomo o początkowych zdarzeniach związanych z

polaryzacją komórek, które poprzedzają formowanie się osi apikalno-bazalnej u roślin wyższych. Wydaje się, że ważną rolę może na tym etapie odgrywać odmienny rozkład składników cytoplazmatycznych, nierównocenny pierwszy podział, a także różna ekspresja genów, do której dochodzić może jedynie w jednej z komórek dwukomórkowego zarodka [26].

Kluczowe znaczenie w kompletowaniu odpowiedzi na postawione pytanie może mieć opracowanie odpowiedniego modelu eksperymentalnego, który pozwoli na prowadzenie badań na tak wczesnym etapie rozwoju. Nowe możliwości zdaje się otwierać opisany w ostatnich latach system regeneracyjny paproci drzewiastej *C. delgadii*, w którym zarodki somatyczne indukowane są bezpośrednio z pojedynczych komórek epidermy eksplantatów inicjalnych na pożywkach bez dodatku regulatorów wzrostu [18]. Opracowanie modelu uwzględniającego pozycję filogenetyczną i opartego na pewnych osobliwościach morfologicznych czy komórkowych, pozwoli na uzyskanie znacznie lepszego zrozumienia procesu embriogenezy i poznania mechanizmów nim sterujących.

NAJWAŻNIEJSZE CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA NABYWANIE EMBRIOGENICZNEJ KOMPETENCJI I JEJ EKSPRESJĘ

Zarodki somatyczne są formowane przez komórki embriogeniczne, pojawiające się wśród komórek somatycznych eksplantatu, kalusa lub zawiesiny komórkowej. Do wejścia na drogę SE zdolne są tylko wybrane komórki somatyczne, które charakteryzują się wrażliwością na czynniki indukujące embriogeniczność. Te właśnie komórki, reprezentujące stan pomiędzy „somatyczną” a „embriogeniczną” nazywane są kompetentnymi. Komórki embriogeniczne są natomiast zdeterminowane do wejścia na drogę SE i już nie wymagają zewnętrznej stymulacji [27,28].

Czynniki, które umożliwiają nabywanie embriogenicznej kompetencji oraz jej ekspresję, mogą być bardzo zróżnicowane, jednak zasadniczo dzielą się na dwie grupy: związane z rośliną donorową (mateczną) oraz związane ze środowiskiem zewnętrznym [29]. Do pierwszej grupy należą: gatunek, genotyp i stan fizjologiczny oraz wiek i stadium rozwojowe rośliny donorowej będącej źródłem eksplantatu. Czynniki związane ze środowiskiem zewnętrznym to z kolei skład pożywki oraz warunki temperaturowe i oświetleniowe, w jakich prowadzona jest kultura. Interakcje pomiędzy wspomnianymi czynnikami prowadzą do indukcji i ekspresji specyficznego modelu różnicowania komórek i ich dalszego rozwoju [28,30]. Tym samym na sukces opracowania protokołu SE dla konkretnej rośliny składają się dwie kwestie: po pierwsze wybór odpowiedniego eksplantatu (tj. zawierającego komórki zdolne do nabycia embriogenicznej kompetencji), po drugie ustalenie fizycznych i chemicznych czynników, które zmieniają dotychczasowy program rozwojowy przełączając go na ścieżkę rozwoju embriogenicznego [28,31].

GATUNEK I GENOTYP ROŚLINY

U niektórych gatunków zaindukowanie SE jest bardzo łatwe. W przypadku marchwi niemal każda część rośliny

może zostać użyta w charakterze eksplantatu, umożliwiając otrzymanie embriogenicznej kultury [31]. Jednak dla wielu gatunków roślin zbożowych czy nagonasiennych tylko w bardzo specyficznych, juwenilnych komórkach i tkankach, np. niedojrzałych zarodkach zygotycznych, można zaindukować odpowiedź embriogeniczną [32,33]. Są również gatunki, dla których, mimo starań, nie udało się dotychczas opracować stabilnego i efektywnego protokołu SE [34].

Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na zdolność do SE jest genotyp rośliny. Te same eksplantanty pobrane z różnych linii albo odmian tego samego gatunku, mimo umieszczenia w identycznych warunkach kultury, mogą reagować z odmienną wydajnością. Jest to szczególnie problematyczne w przypadku roślin użytkowych, ponieważ wymusza optymalizowanie procesu indukcji i ekspresji SE dla każdej uprawianej odmiany [35].

RODZAJ EKSPANTATU, JEGO WIEK I STADIUM ROZWOJOWE

Eksplantatem może być niemal każdy fragment rośliny, jednak do najczęściej wykorzystywanych należą dojrzałe lub niedojrzałe zarodki zygotyczne, siewki i ich fragmenty (liścienie i hypokotyle), ogonki i blaszki liściowe, korzenie, merystemy pędu, nasiona, pąki kwiatowe, czy protoplasty izolowane z różnych tkanek i organów roślinnych [28]. Do indukcji tzw. wtórnej SE wykorzystywane są również zarodki somatyczne. Powszechnie uważa się, że najwięcej komórek kompetentnych zawierają niemerystatyczne, młode tkanki zarodków, siewek oraz części kwiatów [36,37]. O kompetencji komórek decyduje m.in. poziom endogennych hormonów (auksyn, cytokinin i kwasu abscysynowego (ABA), a zwłaszcza synteza i akumulacja endogennej IAA [38].

ROŚLINNE REGULATORY WZROSTU (ANG. PLANT GROWTH REGULATORS, PGRS)

Największy wpływ na indukcję SE i jej ekspresję mają syntetyczne regulatory wzrostu i rozwoju roślin, czyli dodawane do pożywki związki o strukturze i funkcji zbliżonej do fitohormonów. Szacuje się, że co najmniej 93% protokołów indukcji SE u różnych gatunków roślin wymaga użycia regulatorów wzrostu [28]. Kluczowy jest zarówno rodzaj użytych regulatorów, jak i ich względne stężenie. Najważniejszą rolę odgrywają auksyny [31,39], które samodzielnie lub w kombinacji z cytokininą użyto w ponad 80% opisanych przypadkach indukcji SE [28]. Spośród auksyn najczęściej wykorzystuje się kwas 2,4-dichlorofenoksycetowy (2,4-D), który działa nie tylko jako egzogeny analog auksyny, ale też jako czynnik stresowy [40]. Inne popularne auksyny to: kwas 1-naftylooctowy (NAA), IAA, kwas indolilo-3-masłowy (IBA), kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy (picloram) oraz kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoowy (dicamba) [39].

Cytokininowy model indukcji SE opisano w mniej niż 14% protokołów [28]. Do najczęściej stosowanych cytokinin zalicza się N⁶-benzylaminopurynę (BAP), kinetynę, zeatynę oraz tidiazuron. Pozostałe typy regulatorów wzrostu stosowane są przede wszystkim w celu zapewnienia w komórkach odpowiedniego balansu hormonalnego [37].

Już pierwsze badania z udziałem kultur marchwi pokazały, że istotne znaczenie podczas indukcji SE ma forma dostarczonego roślinie azotu (w postaci jonów amonowych NH₄⁺ czy azotanowych NO₃⁻) oraz jego stężenie [41]. Również u innych gatunków roślin jak dynia (*Cucurbita pepo* L.), lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) czy kawowiec (*Coffea arabica* L.) potwierdzono wpływ azotu na odpowiedź eksplantatów [21].

Cukry stanowią źródło węgla dla roślin, odpowiadają też za właściwe ciśnienie osmotyczne pożywki. Zarówno ich rodzaj, jak i stężenie w pożywce wpływają na indukcję i ekspresję SE. W olbrzymiej większości protokołów indukcji SE używa się sacharozy, jednak w przypadku kuczukowca brazylijskiego (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) wyższą efektywność embriogenezy uzyskano zastępując sacharozę maltozą [42], u kukurydzy (*Zea mays* L.) – sorbitolem [43], u bawełny (*Gossypium hirsutum* L.) – glukozą [44], a u winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.) – mieszaniną glukozy z fruktozą [45].

ŚWIATŁO

Wpływ światła na indukcję SE może być związany ze stymulowaniem (fotoaktywacją) lub hamowaniem (np. na drodze fotolizy) różnych endogennych substancji, m.in. fitohormonów. W większości opisanych przypadków indukcję SE prowadzono w warunkach fotoperiodu (49%) lub ciemności (44%). Pozytywny wpływ ciemności odnotowano m.in. u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), słonecznika (*Helianthus annuus* L.), jabłoni (*Malus domestica* Borkh.), czy gatunków z rodzaju *Camellia* [28]. Spektakularnym przykładem protokołu, w którym ciemność jest konieczna do zaindukowania SE, jest wspomniany wcześniej system regeneracyjny paproci drzewiastej *C. delgadii* [18]. Nie chodzi tu jednak o warunki świetlne w czasie wykładania i kultury eksplantatów, tylko o długotrwałe etiolowanie roślin będących ich źródłem. Takie traktowanie zmienia równowagę hormonalną w inicjalnych tkankach i czyni ich komórki kompetentnymi do embriogenezy [46].

Dobór odpowiedniej długości fali świetlnej, zwłaszcza w zakresie barwy czerwonej i niebieskiej pozwala z kolei manipulować efektywnością odpowiedzi embriogenicznej i dalszym rozwojem somatycznych zarodków [47,48].

CZYNNIKI STRESOWE

Na nabywanie embriogenicznego potencjału znacząco wpływają różne zewnętrzne chemiczne i fizyczne czynniki stresowe. Molekularny mechanizm ich działania wciąż nie jest do końca jasny, wiadomo jednak, że stres uruchamia ekspresję czynników transkrypcyjnych, wpływających na ekspresję kolejnych genów, w tym regulujących cykl komórkowy i indukujących SE [30,40]. Kluczowe znaczenie ma czas trwania czynnika stresowego, gdyż zbyt długa ekspozycja na stres może być destrukcyjna dla komórek roślinnych [49].

W normalnych warunkach komórka odbiera sygnały i bodźce z sąsiadujących komórek i tkanek utrzymując swój status fizjologiczny i realizując określony program rozwoju. Ten stan zakłóca wycięcie eksplantatu. Już sam stres wycięcia bywa wystarczający do zaindukowania odpowiedzi embriogenicznej, co zaobserwowano m.in. u *Panax ginseng* C.A. Meyer [50,51] czy *C. delgadii* [18]. Do indukowania SE stosunkowo często wykorzystuje się stres osmotyczny. Podniesienie stężenia sacharozy lub mannitolu w pożywce, bez dodawania do niej egzogennych regulatorów wzrostu, pozwoliło zaindukować somatyczną embriogenezę na eksplantatach fragmentów siewek marchwi [52,53]. U fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) uzyskanie SE wymagało nie tylko użycia pożywki z dodatkiem BAP oraz adeniny, ale również ekspozycji eksplantatów na stres 12% sacharozy przez minimum 12 h [54]. Stres osmotyczny może być również czynnikiem umożliwiającym regenerację zarodków somatycznych z embriogenicznego kalusa i zapewniającym prawidłowy rozwój ich kolejnych stadiów [55,56] oraz zwiększającym efektywność procesu regeneracji [57,58]. Może też zmienić pochodzenie zarodków z wielokomórkowego na jednokomórkowe jak w przypadku *C. delgadii* [59]. Innym popularnym czynnikiem stresowym są jony metali ciężkich: kadmu, niklu czy cynku. Ich dodatek do pożywki Murashige i Skooga (MS) pozbawionej PGRs pozwolił zaindukować SE u marchwi [52,60] i pszenicy (*Triticum aestivum* L.) [61]. Indukcję SE u marchwi uzyskano również dzięki traktowaniu nasion 6% roztworem podchlorynu sodu [52], a segmentów apikalnych siewek 0,1-0,3M roztworem chlorku sodu [62] czy temperaturą 37°C [63]. Warto podkreślić, że stres wysokiej temperatury jest też szeroko stosowany w androgenizie, czyli embriogenezie indukowanej w kulturach pylników i izolowanych mikrospor [64].

INNE

Poza czynnikami bezpośrednio indukującymi SE ważne są również czynniki wpływające na rozwój zarodków somatycznych i ich konwersję w rośliny (wytworzenie korzenia, merystemu wierzchołkowego z zawiązkami liściowymi, zazielenienie liścieni i hypokotyła). Konwersję zarodków, zwłaszcza tych przechodzących stan uśpienia, często poprawia dodatek kwasu giberelinowego [65] czy ABA, desykalacja, traktowanie azotanem srebra czy siarczanem rtęci [66].

ENDOGENNA REGULACJA WCZESNEJ SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Do zaindukowania embriogenezy w komórce somatycznej konieczna jest zmiana jej programu rozwojowego obejmująca przeprogramowanie ekspresji genów, jak również zmiany w fizjologii, metabolizmie i strukturze [67]. Mimo wielu badań nad wczesnymi etapami SE, których wyniki opublikowano w ciągu ostatnich dwóch dekad, nie jest do końca jasne, w jaki sposób somatyczne komórki nabywają totipotencję i inicjują tworzenie zarodka [21,26]. Niemniej jednak, podczas tranzycji embriogenicznej często ulegają one asymetrycznemu podziałowi, na wzór tego, jaki przechodzi zygota. W niektórych systemach SE, rozpoczynających się właśnie od asymetrycznego podziału komórkowe-

go, odnotowano rozwój struktury przypominającej suspenzor (z większej i zwakuolizowanej komórki), co potwierdza podobieństwo do embriogenezy zygotycznej [68]. Choć asymetryczny podział nie jest niezbędny dla zajścia embriogenezy, to nierównocenne rozmieszczenie wewnątrzkomórkowych składników wydaje się kluczowe w jej wczesnych etapach. W kulturach komórkowych marchwi opisano asymetryczną segregację epitopu białka arabinogalaktanowego (rozpoznawanego przez przeciwciało JIM8) determinującego los komórek [69]. Epitop ten był obecny w komórkach embriogenicznych, a po podziale uzyskiwano obraz JIM8-ujemnej komórki potomnej rozwijającej się dalej w zarodek, wspieranej przez komórkę JIM8-dodatnią, pełniącą prawdopodobnie rolę suspensoropodobną. W zarodku zygotycznym już na etapie dojrzałej zygoty widać spolaryzowane rozmieszczenie auksyn, które zmienia się po pierwszym podziale. Na etapie kilkukomórkowego zarodka warunkuje ono ustalenie osi apikalno-bazalnej i dalszy rozwój [70]. W SE nieregularną dystrybucję auksyn, wynikającą z ich zróżnicowanego transportu, wykazano w obrębie tkanki inicjalnej w miejscach, w których różnicują somatyczne zarodki [71]. Daje to przesłanki by sądzić, że polarny transport auksyn jest zaangażowany w indukcję i rozwój zarodka.

Mechanizmy nabywania totipotencji są trudne do badania w systemach, w których regeneracja roślin rozpoczyna się z masy komórek, a nie z jednej komórki somatycznej. U *C. delgadii* zarodki różnicują wprost z pojedynczej komórki epidermalnej eksplantatu ogonka liściowego, dzięki czemu każdy etap rozwoju zarodka jest dobrze widoczny. Przy użyciu nowoczesnych narzędzi, umożliwiających śledzenie strukturalnych przemian pojedynczych komórek, a także zachodzących w nich zmian w skali genomu i epigenomu, paproć ta może przyczynić się do lepszego zrozumienia zagadnienia totipotencji komórek roślinnych.

REAKCJA NA STRES

Poddanie materiału roślinnego warunkom kultury *in vitro* wymaga usunięcia eksplantatu z pierwotnego środowiska tkankowego (wycięcie) i utrzymywania go z suboptymalną podażą składników odżywczych i regulatorów wzrostu (w нефizjologicznych stężeniach), co, jak wspomniano wyżej, generuje efekt stresu [40]. Adaptacja komórek eksplantatu do warunków stresowych obejmuje silną reorganizację komórkową, która pozwala na zmianę dotychczasowego programu rozwojowego [67]. Jednak takie zmiany mogą zostać zainicjowane jedynie wtedy, gdy przez komórkę odbierane są odpowiednie sygnały. Wycięcie samo w sobie, jako czynnik generujący stres, może indukować odróżnicowanie komórek somatycznych i tworzenie kalusa lub somatycznych zarodków [72,73]. Wykazano, że zaraz po izolacji eksplantatu z tkanki macierzystej dochodzi do zmian w produkcji endogennych hormonów takich jak: IAA, ABA, kwas jasmonowy, etylen, cytokininy [46,74,75]. W miejscu cięcia bardzo szybko dochodzi do indukcji czynnika transkrypcyjnego *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1)* zaangażowanego pośrednio, poprzez regulację *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)*, w kontrolę różnicowania komórek, co zostało wykazane u rzodkiewnika i rzepaku (*Brassica napus* L.) [76]. Mimo iż wycięcie eksplantatu poprzedza inicjację większości roślinnych hodowli *in*

in vitro, reakcja na ten stres jest sporadycznie brana pod uwagę w badaniu mechanizmów regeneracji, w tym SE.

ZMIANY STRUKTURALNE I IZOLACJA KOMÓRKI

Badania strukturalne powadzone na różnych gatunkach pozwoliły na wytypowanie zestawu spójnych cech, które charakteryzują komórki o embriogenicznym potencjale, utrzymywane w kulturze kalusowej lub masy proembriogenicznej *in vitro*. Są to: dominujący kształt izodiametryczny, wysoki stosunek powierzchni jądra do cytoplazmy, duże jądra, wyraźne jąderka, małe wakuole i obfitość organelli komórkowych: mitochondriów, rybosomów i retikulum endoplazmatycznego [77-81]. Cechy te wskazują na intensywną syntezę RNA i wysoką aktywność metaboliczną, co może być związane z tworzeniem komórek embriogenicznych, ulegających w późniejszym czasie intensywnym podziałom komórkowym w celu wytworzenia somatycznego zarodka. Wydaje się jednak, że taka charakterystyka nie dotyczy komórek eksplantatu inicjalnego. U paproci drzewiastej *C. delgadii* pokazano, że nawet silnie zwakuolizowane komórki epidermy o długości około 400 μm są zdolne do wchodzenia na drogę podziałów prowadzących do formowania zarodka somatycznego na drodze bezpośredniej SE [25]. Zjawiskiem zaangażowanym w embriogeniczną tranzycję, wskazywanym przez badaczy jako kluczowe i zachodzące jako jedno z pierwszych, jest izolacja symplastowa i apoplastowa komórek [82]. Modyfikacje apoplastu podczas SE obejmują zmiany składu i grubości ściany komórkowej, obecność macierzy zewnątrzkomórkowej, akumulację kalozy i kutyny czy depozycję substancji tłuszczowych [77,83-86]. Izolacja symplastowa natomiast jest związana z ograniczeniem transportu symplastowego poprzez ograniczenie drożności oraz redukcję liczby plasmodesm [77,87,88]. Jak sugerują autorzy, powyższe mechanizmy ułatwiają oddzielenie komórek od ich otoczenia i mogą być uznane za wczesny marker SE. Fizyczna i fizjologiczna izolacja jest warunkiem wstępnym kolejnych zmian metabolicznych, które z kolei są związane ze zmianami w różnicowaniu komórek.

HORMONY I ICH WZAJEMNA RÓWNOWAGA

Somatyczna embriogeneza, ze względu na dużą zmienność czynników indukujących, nie może być traktowana jako specyficzna odpowiedź na jeden lub więcej egzogennie zastosowanych regulatorów. Wzajemne oddziaływanie hormonów i ich endogenne poziomy, będący wskaźnikiem w określaniu specyficzności odpowiedzi komórkowych, uważane są za główny czynnik regulujący nabywanie zdolności embriogenicznych przez somatyczne komórki roślinne [40,67]. Z tego powodu rola sygnalizacji hormonalnej w regulacji proliferacji i różnicowania komórek roślinnych jest szeroko badana. Odpowiedź na poziomie hormonalnym inicjowana jest jako pierwsza w czasie odróżnicowania komórek w obrębie eksplantatów, umożliwiając im przeprogramowanie i podążanie szlakiem SE [89,90]. Ze względu na mnogość gatunków, u których SE indukowana jest przez ich syntetyczne odpowiedniki, auksyny stanowią grupę hormonów najszerzej analizowaną w kontekście indukowania SE. Poza analizą ilościową zmian w ich endogennym poziomie, wykazano szereg interakcji na poziomie genetycznym i epigenetycznym [91,92]. Choć nie tak intensywnie

badane, także cytokininy są niezbędne w fazie wstępnych podziałów komórek w tym procesie [93]. Etylen i ABA, uważane za hormony stresu, mogą również być zaangażowane w nabywanie kompetencji do embriogenezy [94,95]. W badaniach nad hormonalną regulacją SE znacznie więcej uwagi poświęca się rezultatom dodawania PGRs do pożywki, niż możliwej roli fitohormonów obecnych w tkankach. Niewiele też wiadomo o interakcjach egzogennych regulatorów wzrostu z endogennym układem hormonalnym [75]. Wiedza o zawartości fitohormonów w trakcie indukcji SE najczęściej jest ograniczona do analizy jednej bądź dwóch grup związków. Wiadomo, że niektóre hormony odgrywają ważną rolę w SE, ale mogą też oddziaływać wzajemnie na siebie [39]. Jak wykazano, zaburzenie biosyntezy czy transportu jednego fitohormonu może wpływać na zawartość pozostałych [96]. Skupienie uwagi na innych grupach hormonów i zbadanie mechanizmów ich działania jest kluczowe dla zrozumienia interakcji hormonalnych zachodzących w SE.

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE

Ścieżki molekularne zaangażowane w odpowiedź embriogeniczną eksplantatów hodowanych *in vitro* są przedmiotem szczególnego zainteresowania w biologii rozwoju roślin. Ich znajomość przyczynia się do zrozumienia mechanizmów regulacyjnych kontrolujących toti-/pluripotentję w roślinnych komórkach somatycznych [22,78,93,97]. Zidentyfikowano szereg genów takich jak: *BABY BOOM (BBM)*, *LEC1*, *LEC2*, *WUSCHEL (WUS)*, *FUSCA3 (FUS3)*, *ABA INSENSITIVE3 (ABI3)*, *EMBRYOMAKER*, *AtMYB115*, *AtMYB118*, *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* czy *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)*, które kodują czynniki transkrypcyjne, będące jednym z głównych regulatorów procesu SE. W większości są one zaangażowane w procesy związane z metabolizmem i sygnalizacją hormonalną, których rolę potwierdzono w promowaniu regeneracji na drodze SE. Wykazano na przykład, że ektopowa ekspresja *LEC2* jest wystarczająca do wyzwolenia produkcji somatycznych zarodków z tkanki wegetatywnej u rzodkiewnika [98]. W ciągu ostatnich dziesięciu lat analiza danych omicznych przyspieszyła i w znaczący sposób przyczyniła się do identyfikacji interakcji pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi pełniącymi kluczową funkcję w SE a fitohormonami, głównie auksyną [91].

EPIGENOM

Prowadzone w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat badania na poziomie molekularnym pozwoliły na zidentyfikowanie wielu regulatorów transkrypcji, które aktywują lub hamują ekspresję genów w celu promowania różnicowania się komórek. Ważną warstwą regulacyjną jest kontrola na poziomie epigenetycznym, dzięki której specyficzne dla danego *locus* chemiczne modyfikacje DNA i chromatyny zmieniają jej stan i ograniczają ekspresję kluczowych regulatorów rozwoju do określonych okien czasowych i przestrzennych [99,100]. Przeprogramowanie chromatyny na dużą skalę pozwala komórce na uzyskanie epigenetycznego i transkrypcyjnego statusu odmiennego od tego w komórkach sąsiadujących. Przeprogramowanie to charakteryzuje się dekondensacją chromatyny, redukcją heterochromatyny w

jądrze komórkowym, zubożeniem histonów łącznikowych, zmianami w wariantach histonów rdzeniowych oraz w ogólnym krajobrazie modyfikacji histonów [101]. Podobnie jak w wielu innych procesach, chemiczne modyfikacje DNA i chromatyny mogą kształtować transkryptom również w SE. Wykazano bowiem zmiany w dynamice metylacji DNA w trakcie SE indukowanej u różnych gatunków, wpływające znacząco na ekspresję kluczowych dla przebiegu procesu czynników transkrypcyjnych takich jak *LEC1*, *BBM1* czy *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4 (WOX4)* [92,102,103]. Roślinne komórki posiadają praktycznie nieograniczone zdolności do przeprogramowania swojego rozwoju [89]. Z drugiej zaś strony pamięć epigenetyczna jest uznawana przez badaczy za barierę przeprogramowania, gdyż mechanizmy epigenetyczne stabilizują tożsamość komórkową i utrzymują organizację tkanek [100]. Muszą one zatem zostać usunięte bądź ominięte w procesie regeneracji. Nie jest jeszcze jasne, czy plastyczność komórek roślinnych wynika ze zdolności do wymazywania ich tożsamości uruchomienia jedynie takich komórek, które nie wykształciły jeszcze epigenetycznych ograniczeń [104].

MIRNA

Od opisanego po raz pierwszy w 2002 roku obecności miRNA u rzodkiewnika, coraz liczniejsze doniesienia pojawiające się w tym zakresie prowadzą do lepszego zrozumienia znaczenia tych cząsteczek w procesach biologicznych zachodzących u roślin. Badania ostatniej dekady potwierdziły, że te 21-24 nukleotydowe małe RNA, których działanie jest ukierunkowane na wiele genów regulatorowych (w tym czynników transkrypcyjnych), są również zaangażowane w proces powstawania zarodków z tkanek somatycznych [92,105-108]. Przeprowadzone analizy polegają głównie na porównaniu zmian w akumulacji miRNA oraz ekspresji genów w kalusie embriogenicznej i nieembriogenicznej lub na różnych etapach SE. Wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji, hybrydyzację northern, analizę bibliotek małych RNA czy mikromacierze, zidentyfikowano aktywność wielu konserwowanych ewolucyjnie rodzin genów *MIRNA*, charakteryzujących się zmiennym, tkankowo-specyficznym poziomem ekspresji na różnych etapach rozwoju zarodka i wykazano, że miRNA mają wpływ na indukcję SE [109]. Ich kluczową rolę potwierdzono wykorzystując mutanty w genie *DICER-LIKE 1*, kodującym enzym odpowiedzialny za biosyntezę większości roślinnych miRNA, które okazały się być niezbędne do formowania somatycznych zarodków na zarodkach zygocicznych standardowo używanych w tym celu u rzodkiewnika [110]. Cząsteczki miRNA odgrywają ważną rolę w kontrolowaniu SE poprzez ich wpływ na biosyntezę fitohormonów, ich transport i szlaki transdukcji sygnałów [109]. Zostało to dokładnie opisane w przypadku auksyny, regulowanej przez cząsteczki miR165/166, miR167, miR164, miR390 i miR393 poprzez hamowanie odpowiednich genów docelowych związanych z transdukcją sygnału [92,109].

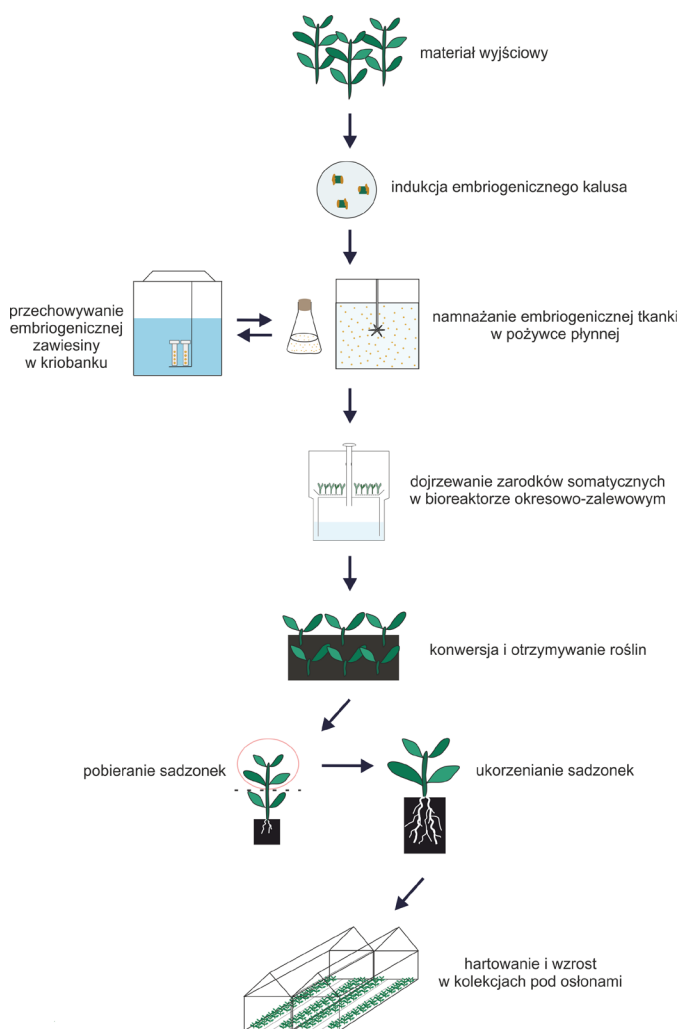
PRAKTYCZNE WYKORZYSTANIE SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY

Postępujące zmiany klimatu, rosnące globalne zapotrzebowanie na żywność oraz popyt na nowe odmiany roślin

ozdobnych wywierają ogromny wpływ na produkcję roślinną [111-113]. W intensyfikacji procesu pozyskiwania i poszerzania różnorodności roślin pomagają dynamicznie rozwijające się technologie rozmnażania, ulepszania i hodowli, w coraz większym stopniu bazujące na technikach kultur *in vitro* [114]. Są one szczególnie cenne dla gatunków charakteryzujących się długim cyklem rozwojowym oraz, z różnych względów, niemożliwych do rozmnażania konwencjonalnymi metodami [115]. Warto podkreślić, że w tej grupie mieści się większość roślin, których roczna światowa produkcja jest liczona w miliardach lub milionach ton, np. trzcina cukrowa (*Saccharum officinarum* L.), ziemniak (*Solanum tuberosum* L.), maniok (*Manihot esculenta* Crantz), bananowiec (*Musa* spp.), czosnek pospolity (*Allium sativum* L.) czy winorośl (*Vitis* spp.) [116]. Wśród różnych sposobów mikrorozmnażania na dużą skalę tej grupy roślin najchętniej wykorzystywana jest SE [117]. Zapewnia ona wysoki współczynnik rozmnażania oraz możliwość włączania dodatkowych etapów usprawniających zabezpieczanie tkanek wyjściowych i wykorzystywanie ich do produkcji nowych genotypów o ulepszonych cechach. U roślin okrytonasiennych najlepiej opisane zostało wykorzystanie tego procesu w produkcji kawowca (*Coffea* spp.) oraz kakaowca właściwego (*Theobroma cacao* L.) [118,119], zaś w przypadku drzew i krzewów iglastych u gatunków należących do rodziny sosnowatych (Pinaceae) [15]. W komercyjnych systemach produkcji roślin użytkowych najczęściej wykorzystuje się pośrednią SE, w której formowanie zarodków jest poprzedzone tworzeniem tkanki kalusowej, a sam proces można dzięki temu lepiej zsynchronizować [119]. Do inicjacji embriogenezy wykorzystuje się różne typy eksplantatów. W przypadku kawowca jest nim najczęściej fragment liścia [120], a u kakaowca pobiera się fragmenty organów generatywnych, takich jak płatki i pylniki [121]. U drzew iglastych powszechnie używanym eksplantatem inicjalnym jest zarodek zygociczny w ściśle określonym stadium rozwoju ontogenetycznego [122]. Dla zbalansowania kosztów masowej produkcji materiału roślinnego opracowano i wdrożono szereg rozwiązań, które z jednej strony pozwalają na intensyfikację wydajności SE, z drugiej zaś umożliwiają jej większą synchronizację, zwłaszcza na etapie dojrzewania zarodków *in vitro* i rozwoju roślin *ex vitro* (Ryc. 2). Komercjalizacja produkcji wymaga zastąpienia hodowli na pożywkach stałych pożywkami płynnymi, co pozwala na większe zautomatyzowanie tego procesu z wykorzystaniem bioreaktorów. Powiązanie SE z krioprezerwacją umożliwia stały dostęp do embriogenicznej tkanki, dzięki czemu odtwarzanie kultur przebiega sprawniej. Poprawę jednorodności uzyskiwanych roślin zapewnia ukorzenianie sadzonek powstałych w wyniku cięcia roślin otrzymanych wcześniej drogą SE.

PODNIOSZENIE EFEKTYWNOŚCI PRODUKCJI ROŚLIN

Do podnoszenia efektywności produkcji roślin uzyskiwanych na drodze SE powszechnie wykorzystywane są bioreaktory, co zostało najlepiej opisane u dwóch odmian kawowca: Arabica F1, gatunku *C. arabica* oraz Robusta, gatunku *C. canephora* [120]. Obie odmiany, dla zachowania cech roślin matecznych, rozmnażane są wyłącznie wegetatywnie [119,123]. Próby zwiększania skali produkcji zarodków somatycznych rozpoczęto od rozwinięcia hodowli w



Rycina 2. Etapy komercyjnej produkcji roślin w kulturach *in vitro* bazującej na procesie somatycznej embriogenezy

pożywkach płynnych, w kolkach Erlenmeyera [124], a następnie w bioreaktorach, które przynajmniej na niektórych etapach produkcji zarodków zastąpiły podłoża stałe [125]. Bioreaktory pozwalają na zautomatyzowanie takich działań jak wymiana pożywki, monitorowanie parametrów hodowli, zbieranie zarodków [126] i skrócenie czasu ich rozwoju [120]. Jednym z powszechniej wykorzystywanych typów bioreaktora jest niewielki bioreaktor okresowo-zalewowy RITA [127]. Jego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie nawet 50 tysięcy zarodków somatycznych z grama embriogenicznej zawiesiny *C. arabica* [119] i 1500 zarodków z 0,5 grama embriogenicznej tkanki dębu szypułkowego (*Quercus robur*) [128]. W bioreaktorze tego typu prowadzono również hodowle zarodków somatycznych takich roślin jak olejowiec gwinejski (*Elaeis guineensis* Jacq.), papaja (*Carica papaya* L.) czy trzcina cukrowa [122]. Następnie zaczęto wykorzystywać większe bioreaktory o horyzontalnej budowie, co zapewniało zarodkom lepszy dostęp światła, a w efekcie zwiększyło procent zarodków dorastających do etapu, w którym mogły zostać użyte jako sadzonki [129]. U roślin iglastych wykazano, że zarówno etap namnażania masy proembriogenicznej (PEM), jak i dojrzewania zarodków somatycznych, mogą być prowadzone w tym samym bioreak-

torze okresowo-zalewowym. Na oddzielenie zarodków od PEM-u oraz selekcję najlepiej rozwiniętych osobników pozwoliła opatentowana technologia zwana Fluidics System. W tym systemie zarodkom przepływającym przez rurkę zarodkom wykonywane są zdjęcia, a następnie w ułamku sekundy dokonywana jest analiza komputerowa ich cech, które porównywane są z wcześniej ustalonymi kryteriami. Dojrzałe, dobrze rozwinięte zarodki są odseparowywane od zarodków niespełniających wymogów i tylko te pierwsze zostają użyte w dalszej produkcji roślin [130].

Wyniki doświadczeń z końca lat 90. XX w. pokazały, że zarodki somatyczne otrzymane w bioreaktorach można przenosić do warunków *ex vitro* już w stadium liścieniowym, co wykorzystano w produkcji kawowca [125]. Wyeliminowano tym samym potrzebę kosztownego etapu aklimatyzacji i ograniczono straty w materiale roślinnym, a uzyskane rośliny charakteryzowały się większym wigorem. Problem wciąż stanowiło niesynchronizowane dojrzewanie zarodków somatycznych uzyskiwanych w bioreaktorach, które przekładało się na niejednorodny wzrost roślin w szkółkach. Generowało to dodatkowe koszty związane z koniecznością ponawiania zbiorów. Optymalnym rozwiązaniem okazało się opracowanie systemu rozmnażania opartego na seryjnym ukorzenianiu sadzonek kawowca (ang. *mini-cuttings*) uzyskiwanych poprzez regenerację zarodków somatycznych. Sadzonki pobiera się drogą cięcia roślin mających 3 pary w pełni rozwiniętych liści. Piętnastotygodniowe ukorzenione sadzonki są bardziej jednorodne pod względem wysokości i średnicy pędu niż będące w tym samym wieku wyjściowe rośliny, uzyskane na drodze SE. Opracowany system zmniejszył koszt produkcji sadzonek o połowę [131]. Metoda ta wykorzystywana jest również u roślin iglastych [117] oraz kakaowca właściwego, u którego umożliwia produkcję 100 sadzonek rocznie z 1 rośliny wyjściowej [118].

KRIOPREZERWACJA W ZABEZPIECZANIU EMBRIOGENICZNYCH TKANEK

Systemy zabezpieczania embriogenicznego potencjału w ciekłym azocie (-196°C) najwcześniej rozwinięto dla roślin iglastych [132,133]. Było to możliwe dzięki wysokiej skuteczności metody powolnego schładzania, która do końca lat 80. XX wieku była jedyną dostępną techniką krioprezerwacji i, jak wykazały ówczesne i późniejsze badania, okazała się być wysoce skuteczna dla tej grupy roślin i tego rodzaju materiału roślinnego [134-136]. Dzięki temu od ponad 30 lat, wykorzystując embriogeniczną tkankę kalusową i zawiesinową, rutynowo tworzone są banki klonów linii elitarnych sosny, świerka, modrzewia, jodły i daglezi, usprawniając tym samym selekcję osobników o pożądanym cechach [134,135,137]. Banki tkanek pozwalają na testowanie roślin pochodzących z części każdej linii komórkowej przez dowolnie długi okres, podczas gdy reszta materiału roślinnego jest utrzymywana w stanie głębokiego zamrożenia do późniejszego wykorzystania. Jest to główny powód, dla którego SE jest chętniej wykorzystywana u drzew iglastych niż inne metody wegetatywnego rozmnażania [138].

W przypadku embriogenicznych kultur wielu innych gatunków, zwłaszcza klimatu tropikalnego, dopiero opracowanie w 1990 r. nowych technik krioprezerwacji (witryfika-

cji i kapsułkowania/dehydratacji) otworzyło drogę do ich efektywnego krioprezerwywania [136]. Od tego czasu, bazujące na SE protokoły, obok intensywnego mikrorozmnażania i regeneracji, obejmują również etap przechowywania tkanek w ciekłym azocie (Ryc. 2). Pozwala on na bezpieczne i długoterminowe gromadzenie embriogenicznej tkanki kalusowej oraz agregatów komórkowych pochodzących z kultur zawieszonych i (w razie potrzeby) ich odtwarzanie. Dzięki temu czas wymagany na odnowienie embriogenicznych kultur, zwłaszcza tych, których potencjał regeneracyjny maleje wraz z wydłużaniem czasu ich prowadzenia, jest skrócony do niezbędnego minimum [120].

Krioprezerwacja odgrywa również ważną rolę w tworzeniu banków embriogenicznych tkanek roślin ozdobnych [139,140]. Poza usprawnianiem ich protokołów regeneracyjnych, wykorzystywanie ciekłego azotu pozwala na kolekcjonowanie licznych, atrakcyjnych odmian, które pojawiają się lawinowo w odpowiedzi na zmieniające się preferencje konsumentów [111]. Odmiany te są ważne dla przemysłu ogrodniczego, ponieważ stanowią źródło cennego materiału hodowlanego.

PRZYKŁADY KOMERCYJNEJ PRODUKCJI ROŚLIN

Wydajne procedury rozmnażania w warunkach kultur *in vitro* bazujące na SE zostały wprowadzone do upraw licznych roślin użytkowych. Wśród nich znajduje się: kawowiec, kokos właściwy (*Cocos nucifera* L.), oliwka europejska (*Olea europaea* L.), winorośl, olejowiec gwinejski, daktylowiec właściwy (*Phoenix dactylifera* L.), herbata chińska (*Camellia sinensis* L.), czy awokado właściwe (*Persea americana* Mill.) [119,141-147]. W latach 2005-2010 firma Nestlé rozpoznała w Tajlandii 1,8 mln sadzonek kawowca odmiany Robusta uzyskanych drogą SE, a w latach 2009-2017 ok. 1,9 mln sadzonek na Filipinach. Co więcej, na przestrzeni 8 lat rozdystrybuowano 10,2 mln sadzonek tej rośliny wśród hodowców w Meksyku. Ponadto CIRAD (Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement), ośrodek specjalizujący się w badaniach nad SE kawowca, produkuje w Nikaragui od 2 do 3 mln roślin rocznie i regularnie eksportuje setki tysięcy sadzonek do krajów sąsiednich [119]. W 2008 r. firma CellFor z siedzibą w Kanadzie oraz Arborgen z USA wyprodukowały z wykorzystaniem SE łącznie około 11 mln sadzonek sosny taeda [148]. Proces SE jest wykorzystywany przez firmę Forest Genetics z Nowej Zelandii do produkcji sosny kalifornijskiej oraz przez Coillte Teoranta z Irlandii do produkcji świerka sitajskiego (*Picea sitchensis* (Bong.) Carrière) [117]. Produkcję na masową skalę z wykorzystaniem tego procesu uzyskano również dla kakaowca. Dzięki narodowemu programowi stworzonemu przez Indonezyjski Instytut Badawczy Kawy i Kakao w latach 2009-2011 wyprodukowano 74,5 mln sadzonek tej rośliny, osiągając efektywność produkcji na poziomie 50 mln roślin rocznie [149]. W Uppsali wspólne wysiłki szwedzkich firm leśnych i uruchomionej w latach 2014-2016 firmy SweTree Technologies zmierzają do produkcji komercyjnej drzew iglastych na poziomie 10 mln sadzonek rocznie [122]. Będzie to możliwe do osiągnięcia dzięki wykorzystaniu wszelkich dostępnych metod pozwalających na automatyzację procesu SE.

Jednym z ważniejszych problemów napotykanym przy wielkoskalowej produkcji roślin na drodze SE jest trudność w uzyskaniu pełnej automatyzacji, co podnosi koszt jednostkowy otrzymywanych ostatecznie roślin. W tym zakresie producenci prześcigają się w dopracowywaniu warunków pozwalających na większą synchronizację kolejnych etapów produkcji. Ponadto pojawiają się problemy logistyczne związane z dotarciem do hodowców mniejszych upraw, czy też obawa opinii publicznej o zubażanie różnorodności biologicznej [119,150]. Innym problemem jest występujące w kulturach *in vitro* zjawisko zmienności somaklonalnej, prowadzące do powstawania osobników o odmiennym fenotypie i/lub genotypie. Zmiany te mogą być efektem warunków stresowych takich jak zranienie, długotrwała ekspozycja na regulatory wzrostu czy starzenie kultur [120]. Zachowanie cech rośliny matecznej jest szczególnie ważne i bezwzględnie wymagane w produkcji komercyjnej roślin [123]. Badania nad SE u kawowca wykazały, że częstotliwość występowania niepożądanych fenotypów (różniących się m.in. wysokością, kolorem i grubością liści) zwiększała się wraz z wydłużaniem wieku używanej zawiesziny komórkowej. Wiedza ta pozwoliła na obniżenie występowania niepożądanego zmienności poprzez używanie kultur nie starszych niż sześciomiesięczne oraz obniżenie stężenia 2,4-D w pożywce [119]. Po latach badań wysoki koszt produkcji roślin na masową skalę wciąż jednak pozostaje głównym czynnikiem ograniczającym rozwijanie tej technologii dla kolejnych gatunków.

PODSUMOWANIE

Embriogeneza somatyczna, po ponad 60 latach od jej opisanie po raz pierwszy, jest obecnie standardowym narzędziem biotechnologicznym wykorzystywanym w laboratoriach naukowych i przemysłowych do klonalnego rozmnażania roślin pod kątem różnych zastosowań. Otrzymywane masowo zarodki somatyczne najczęściej zachowują genotyp i ploidalność rośliny-dawcy. Dzięki temu SE jest wykorzystywana do przyspieszania procesów hodowlanych. Pozwala na zwiększenie skali testowania materiału roślinnego i skrócenie cyklu hodowlanego, co ma szczególne znaczenie w przypadku odmian wysoce heterozygotycznych i roślin o długim cyklu życiowym. SE jest również preferowanym narzędziem regeneracji roślin uzyskiwanych w wyniku transformacji czy w komercyjnej produkcji. Dzięki niej rośliny mogą być otrzymywane jednoetapowo, a nie poprzez sekwencyjną regenerację pędów i korzeni, co jest wymagane podczas organogenezy. Wysoka wydajność tej techniki w połączeniu z możliwością przechowywania embriogenicznej tkanki oraz zarodków somatycznych w ciekłym azocie również przyczynia się do jej większej użyteczności w porównaniu z organogenezą *de novo* czy sadzonkami. Stałe usprawnianie protokołów regeneracyjnych i systemów technologicznych doprowadziło do znacznego wzrostu wydajności i jednolitości produkcji, jak również poprawiło jakość zarodków wielu roślin uprawnych. Pogłębienie wiedzy o SE i mechanizmach leżących u podstaw tego procesu będzie pomocne w dalszym usprawnianiu protokołów i eliminowaniu ograniczeń, które hamują postęp w wykorzystywaniu tego narzędzia.

PIŚMIENNICTWO

1. Gautheret RJ (1985) History of plant tissue and cell culture: a personal account, W: Vasil IK (red) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 2: cell growth, nutrition, cytodifferentiation, and cryopreservation, Academic Press Inc, London, str. 1-59
2. Went FW (1926) On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. Proc Kon Nederl Akad Wetensch Amsterdam 30: 10-19
3. Levine M (1950) The growth of normal plant tissue in vitro as effected by chemical carcinogens and plant growth substances. I. The culture of the carrot tap root meristem. Am J Bot 37 (6): 445-358
4. Wiggins SC (1954) Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. Am J Bot 41(4): 321-326
5. Steward F, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am J Bot 45: 705-708
6. Reinert J (1959) Über ber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta 53: 318-333
7. Kato H, Takeuchi M (1963) Morphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root. Plant Cell Physiol, 4(2): 243-245
8. Nakajima T (1963) On the plant tissue culture with special reference to embryogenesis. Gamma Field Symposium no. 2, Cell Differentiation and Somatic Mutation, str. 25-33
9. Wetherell DF, Halperin W (1963) Embryos derived from callus tissue cultures of wild carrot. Nature 200: 1336-1337
10. Wilmar C, Hellendoorn M (1968) Growth and morphogenesis of *Asparagus* cells cultured *in vitro*. Nature 217: 369-370
11. Vasil IK, Vasil V (1986) Regeneration in cereal and other grass species, W: Vasil IK (red) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability. Academic Press Inc, Orlando, str. 121-150
12. Durzan DJ, Steward FC (1968) Cell and tissue culture of white spruce and jack pine. Bi-Mon Res Notes Can For Serv 24: 30
13. Chalupa V (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.). Karst Comm Inst For Cech 14: 57-63
14. Nagmani R, Bonga JM (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. Can J Res, 15: 1088-1091
15. Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter MA, Trontin JF (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000, W: Germanà MA, Lambardi M (red) *In vitro* embryogenesis in higher plants. Springer, New York, str. 131-166
16. Atmane N, Blervacq AS, Michaux-Ferriere N, Vasseur J (2000) Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes). Plant Sci 156:159-167
17. Szypuła W, Pietrosiuk A, Suchocki P, Olszowska O, Furmanowa M, Kazimierska O (2005) Somatic embryogenesis and *in vitro* culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A. Plant Sci 168:1443-1452
18. Miłkuła A, Pożoga M, Tomiczak K, Rybczyński JJ (2015) Somatic embryogenesis in ferns: a new experimental system. Plant Cell Rep 34: 783-794
19. Tisserat B, Esan EB, Murashige T (1979) Somatic embryogenesis in Angiosperms, W: Janick J (red) Horticultural reviews. Vol. 1. Avi Publishing Co Inc, Westport, str. 1-78
20. Thorpe TA (1995) In vitro embryogenesis in plants (current plant science and biotechnology in agriculture). Springer Science+Business Media, Dordrecht, The Netherlands, str. 1-558
21. Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, Juárez-Gómez YL, Skeete A, Avilez-Montalvo J, De-la-Peña C, Loyola-Vargas VM (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. Front Plant Sci 10: 77
22. Salaün C, Lepiniec L, Dubreucq B (2021) Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. Plants 10(7): 1467
23. Loyola-Vargas VM, De-la-Peña C, Galaz-Avalos RM, Quiroz-Figueroa FR (2008) Plant tissue culture. An intemporal set of tools, W: Walker JM, Rapley R (red) Molecular biomethods handbook. Humana Press, Totowa, str. 875-904
24. Vogel G (2005) How does a single cell become a whole plant? Science 309(5731): 86
25. Miłkuła A, Tomaszewicz W, Dziurka M, Kaźmierczak A, Grzyb M, Sobczak M, Zdańkowski P, Rybczyński JJ (2021) The origin of the *Cyathea delgadii* Sternb. somatic embryos is determined by the developmental state of donor tissue and mutual balance of selected metabolites. Cells 10: 1388
26. Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim Biophys Acta 1849: 385-402
27. de Jong AJ, Schmidt EDL, de Vries SC (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. Plant Mol Biol 22: 367-377
28. Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul 43: 27-47
29. Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. Acta Biol Szeged 52: 53-56
30. Nic-Can GI, Avilez-Montalvo JR, Avilez-Montalvo RN, Márquez-López RE, Mellado-Mojica E, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM (2016) The relationship between stress and somatic embryogenesis, W: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (red) Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, Cham, str.151-170
31. Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. Plant Growth Regul 47: 91-110
32. Eudes F, Acharya S, Laroche A, Selinger LB, Cheng KJ (2003) A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. Plant Cell Tiss Org Cult 73: 147-157
33. Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 38: 93-105
34. Solís-Ramos YL, Andrade-Torres A, Carbonell LAS, Salín CMO, de la Serna EC (2012) Somatic embryogenesis in recalcitrant plants, W: Sato K (red) Embryogenesis. IntechOpen, str. 597-618
35. Rohit J, Paramod K (2013) Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. Agric Rev 34: 1-20
36. Carman JG (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 26: 746-753
37. Gutierrez-Mora A, González-Gutiérrez GA, Rodríguez-Garay B, Lora-Quezada MM, Rodríguez-Garay B (2012) Plant somatic embryogenesis: some useful considerations, W: Sato K (red) Embryogenesis. IntechOpen, str. 229-248
38. Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Physiol 129: 1807-1819
39. Jiménez VM, Thomas C (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis, W: Mujib A, Samaj J (red) Somatic embryogenesis. Plant Cell Monogr, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 103-118
40. Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. Electron J Biotechnol 13: 1-9
41. Reinert J, Tazawa M, Semenoff S (1967) Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. Nature 216: 1215-1216
42. Blanc G, Michaux-Ferrière N, Teisson C, Lardet L, Carron MP (1999) Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tiss Org Cult 59: 103-112
43. Swedlund B, Locy RD (1993) Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. Plant Physiol 103: 1339-1346

44. Ganesan M, Jayabalan N (2005) Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. *Indian J Exp Biol* 43: 921–925
45. Yancheva SD, Roichev V (2005) Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Biotechnol Equip* 19: 62–66
46. Grzyb M, Kalandyk A, Waligórski P, Mięka A (2017) The content of endogenous hormones and sugars in the process of early somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell Tiss Org Cult* 129: 387–397
47. Michler CH, Lineberger RD (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11: 189–207
48. Varis S, Tikkinen M, Välimäki S, Aronen T (2021) Light spectra during somatic embryogenesis of norway spruce-impact on growth, embryo productivity, and embling survival. *Forests* 12: 301
49. Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34: 107–114
50. Choi YE, Soh WY (1994) Origin of somatic embryo induced from cotyledons of zygotic embryos at various developmental stages of ginseng. *J Plant Biol* 37: 365–370
51. Choi YE, Soh WY (1996) Effect of plumule and radicle on somatic embryogenesis in the cultures of ginseng zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45: 137–143
52. Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue T, Harada H (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 25: 1163–1166
53. Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Cult Lett* 10: 38–44
54. Cabrera-Ponce JL, López L, León-Ramírez CG, Jofre-Garfias AE, Verver-y-Vargas A (2015) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma* 252: 559–570
55. Linossier L, Veisseire P, Cailloux F, Coudret A (1997) Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Sci* 124: 183–191
56. Holobiuc I (2015) Somatic embryogenesis in long-term cultures of *Gentiana lutea* L. in the presence of osmotic stress, W: Rybczyński JJ, Davey MR, Mięka A (red) The gentianaceae - volume 2: biotechnology and applications. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str.139–161
57. Lou H, Kako S (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci Hort* 64: 11–20
58. Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, Ostad-Ahmadi P (2006) Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci Hort* 110: 340–344
59. Grzyb M, Mięka A (2019) Explant type and stress treatment determine the uni- and multicellular origin of somatic embryos in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell Tiss Org Cult* 136: 221–230
60. Kiyosue T, Takano K, Kamada H, Harada H (1990) Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can J Bot* 68: 2301–2303
61. Patnaik D, Mahalakshmi A, Khurana P (2005) Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian J Exp Biol* 43: 740–745
62. Kiyosue T, Kamada H, Harada H (1989) Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. *Plant Tissue Cult Lett* 6: 162–164
63. Kamada H, Tachikawa H, Saitou T, Harada H (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cult Lett* 11: 229–232
64. Iqbal MCM, Wijesekara KB (2007) A brief temperature pulse enhances the competency of microspores for androgenesis in *Datura metel*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 89: 141–149
65. Choi YE, Yang DC, Choi KT (1998) Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52: 177–181
66. Castillo AM, Egaña B, Sanz JM, Cistué L (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep* 17: 902–906
67. Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 201–228
68. Smertenko A, Bozhkov PV (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *J Exp Bot* 65: 1343–1360
69. Souter M, Lindsey K (2000) Polarity and signalling in plant embryogenesis. *J Exp Bot* 51: 971–983
70. Tian R, Paul P, Joshi S, Perry SE (2020) Genetic activity during early plant embryogenesis. *Biochem J* 477: 3743–3767
71. Márquez-López RE, Pérez-Hernández C, Ku-González Á, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM (2018) Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* 255: 695–708
72. Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21: 508–514
73. Mięka A, Pożoga M, Grzyb M, Rybczyński JJ (2015) An unique system of somatic embryogenesis in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb.: the importance of explant type, and physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss Org Cult* 123: 467–478
74. León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52: 1–9
75. Ayil-Gutiérrez B, Galaz-Avalos RM, Peña-Cabrera E, Loyola-Vargas VM (2013) Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signal Behav* 8: 1–10
76. Iwase A, Mita K, Nonaka S, Ikeuchi M, Koizuka C, Ohnuma M, Ezura H, Imamura J, Sugimoto K (2015) WIND1-based acquisition of regeneration competency in Arabidopsis and rapeseed. *J Plant Res* 128: 389–397
77. Verdeil JL, Hoche V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, Nicole M (2001) Ultrastructural changes in cocunut calli-associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot* 88: 9–21
78. Rocha DIR, Pinto DLP, Vieira LM, Tanaka FAO, Dornelas MC, Otoni WC (2016) Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of *SERK* gene expression. *Protoplasma* 253: 595–609
79. Borji M, Bouamama-Gzara B, Chibani F, Teyssier C, Ammar AB, Mliki A, Zekri S, Ghorbel A (2018) Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var „Meliane”). *Plant Cell Tiss Org Cult* 132: 329–342
80. Oliveira EJ, Koehler AD, Rocha DI, Vieira LM, Pinheiro MVM, Matos EM, Cruz ANF, Silva TCR, Tanaka FAO, Nogueira FIS, Otoni WC (2017) Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma* 254: 2017–2034
81. de Araújo Silva-Cardoso IM, Meira FS, Gomes ACMM, Scherwinski-Pereira JE (2020) Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. *Physiol Plant* 168: 845–875
82. Marzec M, Kurczynska E (2014) Importance of symplasmic communication in cell differentiation. *Plant Signal Behav* 9: e27931
83. Potocka I, Baldwin TC, Kurczynska EU (2012) Distribution of lipid transfer protein 1 (LTP1) epitopes associated with morphogenic events during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 31: 2031–2045
84. Grimault V, Helleboid S, Vasseur J, Hilbert JL (2007) Co-localization of β -1,3-glucanases and callose during somatic embryogenesis in cichorium. *Plant Signal Behav* 2: 455–461
85. Kurczynska EU, Potocka I, Dobrowolska I, Kulinska-Lukaszek K, Sala K, Wrobel-Marek (2012) Cellular markers for somatic embryogenesis, W: Sato K (red) Embryogenesis. IntechOpen, str. 307–332

86. Tao L, Yang Y, Wang Q, You X (2012) Callose deposition is required for somatic embryogenesis in plasmolyzed *Eleutherococcus senticosus* zygotic embryos. *Int J Mol Sci* 13: 14115–14126
87. Grzyb M, Wróbel-Marek J, Kurczynska E, Sobczak M, Mikula A (2020) Symplasmic isolation contributes to somatic embryo induction and development in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell Phys* 61: 1273–1284
88. Godel-Jedrychowska K, Kulinska-Lukaszek K, Horstman A, Soriano M, Li M, Malota K, Boutilier K, Kurczynska EU (2020) Symplasmic isolation marks cell fate changes during somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 71: 2612–2628
89. Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143: 1442–51
90. Mozgová I, Muñoz-Viana R, Hennig L (2017) PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Gen* 13: e1006562
91. Wójcik AM, Wójcikowska B, Gaj MD (2020) Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci* 21: 1333
92. Wójcikowska B, Wójcik AM, Gaj MD (2020) Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci* 21: 2307
93. Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J Chem Biol* 2: 177–190
94. Zheng Q, Zheng Y, Perry SE (2013) AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in *Arabidopsis* and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiol* 161: 2113–2127
95. Nowak K, Wójcikowska B, Gaj MD (2015) ERF022 impacts the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through the ethylene-related pathway. *Planta* 241: 967–985
96. Grzyb M, Kalandyk A, Mikula A (2018) Effect of TIBA, fluridone and salicylic acid on somatic embryogenesis and endogenous hormone and sugar contents in *Cyathea delgadii* Sternb. *Act Phys Plant* 40:1
97. Gulzar B, Mijub A, Malik MQ, Sayeed R, Mamgain J, Ejaz B (2020) Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *J Genet Eng Biotechnol* 18: 31
98. Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *PNAS* 98: 11806–11811
99. Ikeuchi M, Iwase A, Sugimoto K (2015) Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol* 28: 60–67
100. Birnbaum KD, Roudier F (2017) Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. *Regeneration* 4: 15–20
101. She W, Grimanelli D, Rutowicz K, Whitehead MWJ, Puzio M, Kotliński M, Jerzmanowski A, Baroux C (2013) Chromatin reprogramming during the somatic to reproductive cell fate transition in plants. *Development* 140: 4008–4019
102. Nic-Can GI, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Pena C (2013) New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One* 8: e72160
103. Viejo M, Rodriguez R, Valledor L, Perez M, Canal MJ, Hasbun R (2010) DNAmethylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sex Plant Reprod* 23: 315–323
104. Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* 21: 212–218
105. Wu X, Liu MM-Y, Ge X-X., Xu Q, Guo W-W (2011) Stage and tissue specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* 233: 495–505
106. Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L (2012) Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* 236: 647–657
107. Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 64: 1521–1536
108. Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J, Wójcik AM, Nowak K, Szczygieł-Sommer A, Szwejkowska-Kulińska Z, Jarmłowski A, Gaj MD (2017). MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 8: 18
109. Jin L, Yarra R, Zhou L, Zhao Z, Cao H (2020) miRNAs as key regulators via targeting the phytohormone signaling pathways during somatic embryogenesis of plants. *3 Biotech* 10: 495
110. Wójcik AM, Gaj MD (2016) miR393 contributes to the embryogenic transition induced *in vitro* in *Arabidopsis* via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta* 244: 231–243
111. Kulus D (2016) Application of cryogenic technologies and somatic embryogenesis in the storage and protection of valuable genetic resources of ornamental plants, W: A Mujib (red) *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*. Springer, New Delhi, str. 1–25
112. Luo Z, Sun OJ, Ge Q, Xu W, Zheng J (2007) Phenological responses of plants to climate change in an urban environment. *Ecol Res* 22: 507–514
113. Raza A, Razaq A, Mehmood SS, Zou X, Zhang X, Lv Y, Xu J (2019) Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review. *Plants* 8(2): 34
114. Guan Y, Li SG, Fan XF, Su ZH (2016) Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Front Plant Sci* 7: 938
115. Isah T (2016) Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol Plant* 38: 118
116. FAO (2010) The state of *ex situ* conservation, W: Commission on Genetics Resources for Food and Agriculture Food and Agriculture Organization of the United Nations (red) The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture, Rome, str. 55–90
117. Lelu-Walter MA, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9: 883–899
118. Guillou C, Filloleau A, Brulard E, Verdier D, Mathieu S, Landmann A, Françoise L, Fontanel A, Ducos JP, Buchwalder A, Pierre B (2014) Nestlé Cocoa plan: cocoa propagation by somatic embryogenesis, W: Park YS, Bonga JM (red) Proceedings of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies. Vitoria-Gasteiz, str. 75–80
119. Etienne H, Breton D, Breitler JC, Bertrand B, Déchamp E, Awada R, Marraccini P, Lérant S, Alpizar E, Campa C, Courtel P, Georget F, Ducos JP (2018) Coffee somatic embryogenesis: how did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species? *Front Plant Sci* 9: 1630
120. Campos NA, Panis B, Carpentier SC (2017) Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Front Plant Sci* 8: 1460
121. Tan CL, Furtek DB (2003) Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Sci* 164: 407–412
122. Egertsdotter U, Ahmad I, Clapham D (2019) Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Plant Sci* 10: 109
123. Etienne H, Bertrand B, Dechamp E, Maurel P, Georget F, Guyot R, Breitler JC (2016) Are genetic and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genet Embryol* 6: 1
124. Neuenschwander B, Baumann TW (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 10: 608–612

125. Etienne-Barry D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H (1999) Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep* 19: 111-117
126. Ducos JP, Labbe G, Lambot C, Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 43: 652-659
127. Menéndez-Yuffá A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 297-307
128. Mallón R, Coveló P, Vieitez AM (2012) Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees* 26: 731-741
129. Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E, Verdeil JL, Barry-Etienne D (2013) Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiol* 33: 640-653
130. Aidun CK, Egertsdotter U (2018) SE Fluidics System, W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 1, Springer, Cham, str. 211-227
131. Georget F, Courtel P, Garcia EM, Hidalgo M, Alpizar E, Breidler JC, Bertranda B, Etienne H (2017) Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. *Sci Hortic* 216: 177-185
132. Gupta PK, Durzan DJ, Finkle BJ (1987) Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can J Forest Res* 17: 1130-1134
133. Attree SM, Fowke LC (1991) Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers, W: Bajaj YPS (red) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 17, High-tech and micropropagation, Springer-Verlag, Berlin, str. 53-70
134. Cyr DR (2000) Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. W: F Engelmann, H Takagi (red) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, str. 261-268
135. Panis B, Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crop and forest trees). The role of biotechnology. Electronic forum on biotechnology in Food and Agriculture. International workshop, 5-7 March 2005, Turin, str. 43-54
136. Lambardi M, Ozudogru EA, Benelli C (2008) Cryopreservation of embryogenic cultures, W: Reed BM (red) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, New York, str. 177-210
137. Cyr DR (1999) Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry, W: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (red) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 4, Kluwer Acad Publ, Dordrecht, Boston, London, str. 239-261
138. Bonga JM (2016) Conifer clonal propagation in tree improvement programs, W: Park YS, Bonga JM, Moon HK (red) Vegetative propagation of forest trees, National Institute of Forest Science, Seoul, str. 3-31
139. Winkelmann T, Mußmann V, Serek M (2004) Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Cell Rep* 23: 1-8
140. Kim HM, Shin JH, Sohn JK (2006) Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying. *Cryobiology* 53: 69-74
141. Nguyen QT, Bandupriya HDD, López-Villalobos A, Sisunandar S, Foale M, Adkins SW (2015) Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): a review. *Planta* 242: 1059-1076
142. Sánchez-Romero (2018) Olive *Olea europaea* L., W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 2, Springer, Cham, str. 25-38
143. Gribaudo I, Gambino G (2018) Grapevine (*Vitis* spp.), W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 2, Springer, Cham, str. 151-160
144. Hashim AT, Ishak Z, Rosli SK, Ong-Abdullah M, Ooi SE, Husri MN, Bakar DA (2018) Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryogenesis, W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 2, Springer, Cham, str. 209-230
145. Al-Khayri JM (2018) Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from shoot tip explants, W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 2, Springer, Cham, str. 231-244
146. Kaviani B (2018) Tea (*Camellia sinensis* L.), W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Vol. 2, Springer, Cham, str. 245-252
147. O'Brien C, Hiti-Bandaralage JCA, Hayward A, Mitter N (2018) Avocado (*Persea americana* Mill.), W: Jain SM, Gupta P (red) Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants Vol. 2, Springer, Cham, str. 305-328
148. Grossnickle SC, Pait J (2008) Somatic embryogenesis tissue culture for applying varietal forestry to conifer species, W: Dumroese RK, Riley LE (red) National proceedings: forest and conservation nursery associations-2007. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-57: 135-139
149. Maximova S, Guiltinan MJ (2015) Tissue culture, W: Laliberté B, End M (red) Supplying new cocoa planting material to farmers: A review of propagation methodologies. *Biodivers Int J*, Rome, str. 67-87
150. Thompson D (2014) Challenges for the large-scale propagation of forest trees by somatic embryogenesis - a review, W: Park YS, Bonga JM (red) Proceedings of the 3rd international conference of the IU-FRO unit 2.09.02 on Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies, Vitoria-Gasteiz, str. 81-91

Somatic embryogenesis: from discovery through investigation to application

Anna Mikula✉, Karolina Tomiczak, Małgorzata Grzyb, Wojciech Tomaszewicz

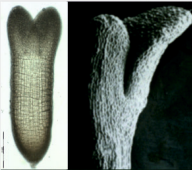

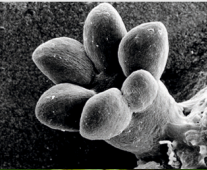

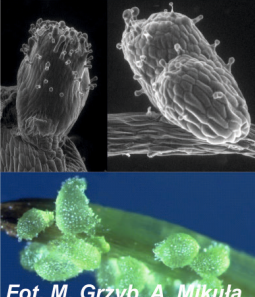
Polish Academy of Sciences Botanical Garden – Center for Biological Diversity Conservation in Powsin

✉corresponding author: a.mikula@obpan.pl

Key words: induction of embryogenesis, *in vitro* culture, micro-propagation, totipotency, somatic embryo

ABSTRACT

Plant cells possess the remarkable ability to adapt to environmental changes. It is manifested by formation of embryos directly from the cells of plant body, bypassing the fertilization stage. These embryo structures develop into complete plants. The process itself, to distinguish the path of formation and emphasize consistency with zygotic embryogenesis, is referred to as somatic embryogenesis (SE). Although more than 60 years have passed since the first publication on the phenomenon has been written, the mechanism of reprogramming of a somatic cell into an embryogenic one is still not fully understood. This is a critical step in SE that can be induced by exo- and endogenous factors and stress treatments. The exposition of plant material to these factors affects the reorganization of the chromatin structure and gene expression, which can consequently trigger the program of embryogenesis. The paper reviews current knowledge on how the identity of totipotent cells is determined and which stimuli are required to reprogram somatic cell development. Knowledge of key molecular regulators and the network of relationships that control SE induction is summarized. Issues that are important for enhancing the understanding of the mechanisms underlying totipotency are also defined. Finally, the practical potential of SE is demonstrated, and examples of its use are provided.

<i>Spermatophyta</i>			<i>Lycopodiophyta</i>	<i>Monilophyta</i>
dwuliścienne	jednoliścienne	nagonasienne	widlaki	paprocie
				
Fot. A. Mikula	Fot. J. Rybczyński	Fot. M. Latkowska	Fot. W. Szypuła	Fot. M. Grzyb, A. Mikula
1958	1968	1985	2000	2015
<i>Daucus carota</i> L. (Steward i wsp. 1958; Reinert 1959)	<i>Asparagus officinalis</i> L. (Wilmar, Hellendoorn 1968)	<i>Picea abies</i> Karst. <i>Larix decidua</i> Mill. (Chalupa 1985; Nagmani, Bonga 1985)	<i>Lycopodiella inundata</i> (L.) Holub (Atmane i wsp. 2000)	<i>Cyathea delgadii</i> Sternb. (Mikula i wsp. 2015)