

WOJCIECH BURZA

*Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa*

STEROWANIE MORFOGENEZĄ ROŚLIN W KULTURACH *IN VITRO*

WSTĘP

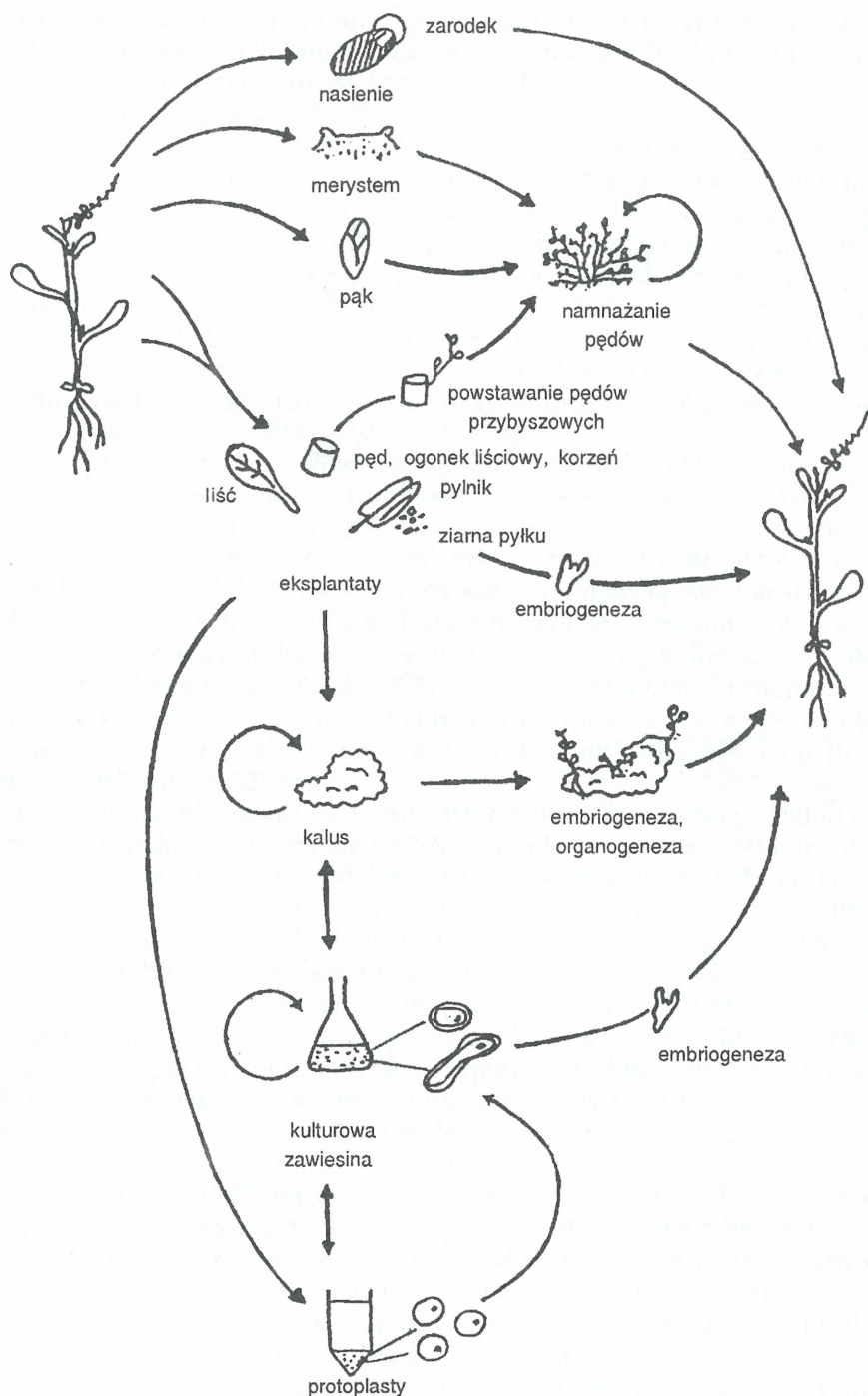
Rośliny, podobnie jak i inne wyższe organizmy, przechodzą w trakcie cyklu życiowego przez fazę rozwoju wegetatywnego i generatywnego. Rozwój zygoty w procesie embriogenezy u roślin różni się jednak znacznie od analogicznego procesu u zwierząt. Nie występuje w nim etap gastrulacji, a docelowe przestrzenne zorganizowanie zarodka jest wyłącznie wynikiem ciągu specyficznych podziałów zapłodnionej komórki jajowej. Ponadto u roślin proces organogenezy nie obejmuje całego zarodka, ale jest ograniczony do bazalnego i apikalnego bieguna, gdzie znajduje się stożek wzrostu korzenia oraz pędu. Wegetatywny wzrost roślin w fazie sporofitycznej jest realizowany poprzez rozwój organów, których primordia są widoczne już w zarodku. Proces organogenezy z wyłączeniem powstawania liścieni przebiegający w trakcie całego cyklu życiowego wydaje się być głównie pod kontrolą obydwu typów merystemów. W określonych warunkach merystem stożka wzrostu pędu przechodzi z fazy wegetatywnej w generatywną. Następnie powstają primordia kwiatowe, z których rozwijają się poszczególne elementy kwiatów.

Od kilku dziesięcioleci próbuje się dla celów badawczych oraz praktycznych sterować cyklem życiowym roślin lub modyfikować jego elementy w warunkach kultury *in vitro*. Doprowadziło to do opracowania technologii rozmnażania klonalnego na dużą skalę. Różnorodność technik jakimi dysponuje się obecnie w roślinnych kulturach tkankowych ilustruje rycina 1.

W warunkach kultury *in vitro* możemy wyróżnić trzy zasadnicze procesy morfogenetyczne dotyczące wczesnego rozwoju roślin: a) embriogenezę somatyczną (SE), b) organogenezę pędową oraz c) organogenezę korzeniową.

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA

SE *in vitro* może zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio przez fazę kalusa. Zwykle jest opisywana jako proces prowadzący do wytworzenia, na drodze zbliżonej do zygotycznej embriogenezy, bipolarnych struktur



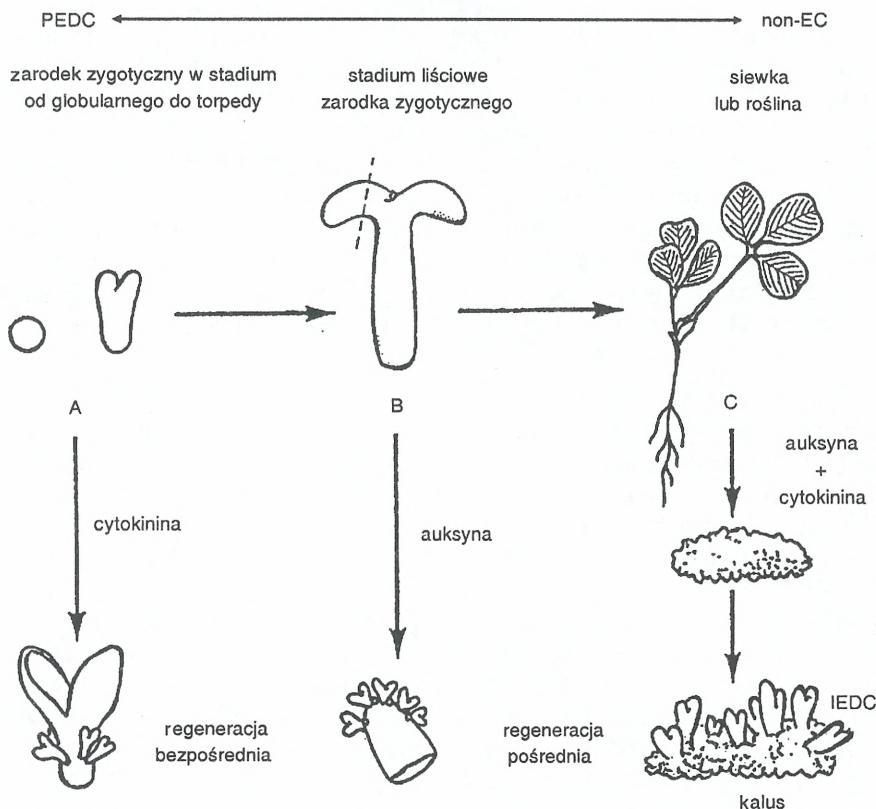
Ryc. 1. Różnorodne techniki namnażania powszechnie stosowane w kulturach tkankowych wykorzystujące totipotencjalne właściwości komórek roślinnych (za SMITH i DREW 1990 zmodyf.).

z tkanki somatycznej, które w odpowiednich warunkach mogą wytworzyć funkcjonalny system pędowy i korzeniowy. SE jest uważana za odmienną ścieżkę rozwojową od organogenezy (HACCIUS 1978). Bipolarna struktura powstająca z pojedynczej komórki lub ich niewielkiej grupy, zawierająca obydwie typy merystemów, nigdy nie jest połączona systemem wiązek przewodzących z eksplantatem wyjściowym. Co więcej zależność między SE a organogenezą ma charakter hierarchiczny. Formowanie organów pędu i korzenia jest wynikiem realizacji dwóch odrębnych programów genetycznych, które przebiegają podczas tworzenia się zarodków i są regulowane przez inne geny. Geny te mogą kontrolować między innymi położenie merystemu pędu i korzenia, wielkość zarodka, prawidłowy przebieg morfogenezy (KITANO i współaut. 1993).

INDUKCJA „EMBRIOGENICZNOŚCI” W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH

Wszystkie komórki somatyczne rośliny zawierają pełny zestaw informacji genetycznej konieczny do wytworzenia kompletnej i funkcjonalnej rośliny oraz zapewnienia prawidłowego przebiegu całego cyklu życiowego. W przeciwieństwie do zwierząt, u których proces różnicowania uważa się w zasadzie jako nieodwracalny, u roślin wykazano możliwość zainicjowania SE praktycznie z każdej części rośliny. Indukcja SE z tkanek danego eksplantatu musi się zatem wiązać ze zmianą pierwotnego wzoru ekspresji genów na „embriogeniczną” ekspresję genów. Jednym z mechanizmów regulacji tej ekspresji może być metylacja DNA (LOSCHIAVO i współaut. 1989). Dowiedziono również, że embrio-specyficzne wzory metylacji DNA są związane także z dalszym przebiegiem SE (VERGARA i współaut. 1990). Komórki, które będąc nieembriogenicznymi nabrały embriogenicznej kompetencji, zostały określone przez EVANSA i współautorów (1981) oraz SHARPA i współautorów (1983) jako „zaindukowane embriogenicznie zdeterminowane komórki” IEDC (ang. induced embryogenic determined cell) dla odróżnienia od tych, które już pierwotnie taką kompetencję posiadały „preembriogenicznie zdeterminowane komórki” PEDCs (ang. preembryogenic determined cells). Wpływ rodzaju explantatu z punktu widzenia pierwotnej embriogenicznej kompetencji komórek go tworzących na indukcję SE ilustruje rycina 2. Oczywiście schemat przedstawiony na rycinie 2 jest może nazbyt uproszczony i nie opisuje wszystkich istotnych rodzajów reakcji morfogenetycznych, które zaobserwowano *in vitro*. Założenie, że tkanki siewek i roślin są pozbawione pierwotnej embriogenicznej kompetencji nie w pełni odpowiada rzeczywistości. Przykładem może być opisana regeneracja bezpośrednia z mikroeksplantatów liściowych ogórka (BURZA i MALEPSZY 1995) pokazana na rycinie 5d, bezpośrednia embriogeneza z korzeni *Camelia japonica* (VIEITEZ i współaut. 1991), czy też bezpośrednia embriogeneza z protoplastów izolowanych z mezofilu liściowego *Brassica juncea* (EAPEN i współaut. 1989).

Oprócz regulatorów wzrostu, w tym szczególnie auksyn, udało się w wielu przypadkach zaindukować SE działając na eksplantaty warunkami stresowymi, takimi jak: szok cieplny, warunki beztlenowe, niska temperatura, jony metali ciężkich (przegl. MERKLE i współaut. 1995). Przypuszcza się, że mechanizm wyzwalany w tkance pod wpływem stresu lub auksyny jest zbliżony do tego, który pojawia się w czasie sporogenezy (HERBERLE-BORS 1985).

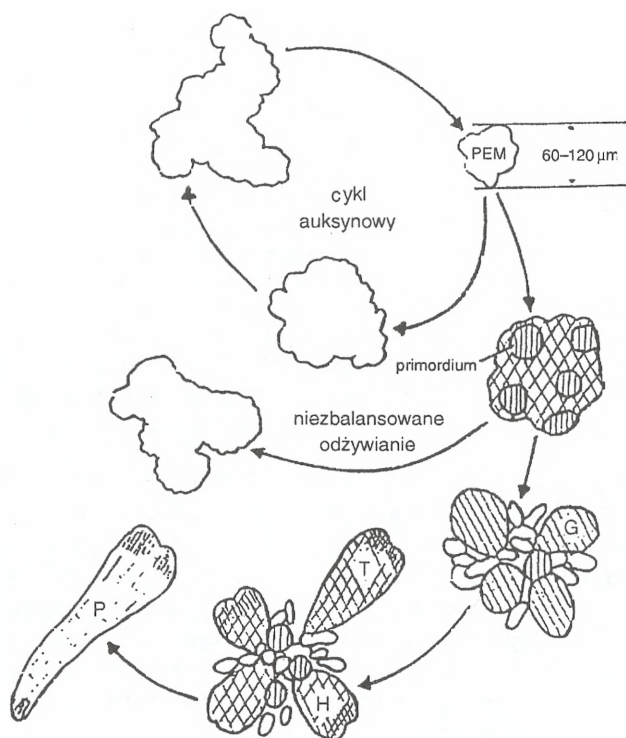


Ryc. 2. Wpływ pierwotnej kompetencji komórek eksplantatu na indukcję SE. Komórki eksplantatu pierwotnego mogą być w stanie kompetencji pomiędzy PEDC (preembryogenicznie zdeterminowane komórki) a non-EC (ang. non-embryogenic cells — komórki nieembryogeniczne). (A) Bardzo młode zarodki zygotyczne mają status najbardziej zbliżony do PEDC i ich odpowiedzią na działanie cytokininy będzie formowanie zarodków somatycznych. (B) Bardziej dojrzałe zarodki zygotyczne osiągają stan, w którym nie wystarczy już sama cytokinina. Wymagają auksyny do indukcji zarodków somatycznych. (C) W tkankach roślin zbudowanych z komórek nieembryogenicznych ale embriogenicznie indukowalnych działanie auksyny i cytokininy prowadzi do uformowania się kalusa zdolnego do wytworzenia zarodków somatycznych (MERKLE i współaut. 1995).

MODELOWE SYSTEMY WCZESNYCH STADIÓW SE NA PRZYKŁADZIE MARCHWI

Rośliną modelową we wcześniejszych i obecnych badaniach dotyczących SE jest *Daucus carota*. Już w 1959 r. REINERT opublikował pracę, w której dowodził, że rośliny marchwi pojawiające się w kulturze kalusa powstały z bipolarnych zarodków rozwijających się z pojedynczych komórek. Dokładny przebieg SE przedstawił HALPERIN (1966, 1970). Wkrótce po zaindukowaniu powstawania z eksplantatu pierwotnego kalusa powstają także wielokomórkowe agregaty o charakterze embriogenicznym nazwane masą proembryogeniczną PEM (ang. proembryogenic mass). Określenie to HALPERIN utworzył w oparciu o nazewnictwo

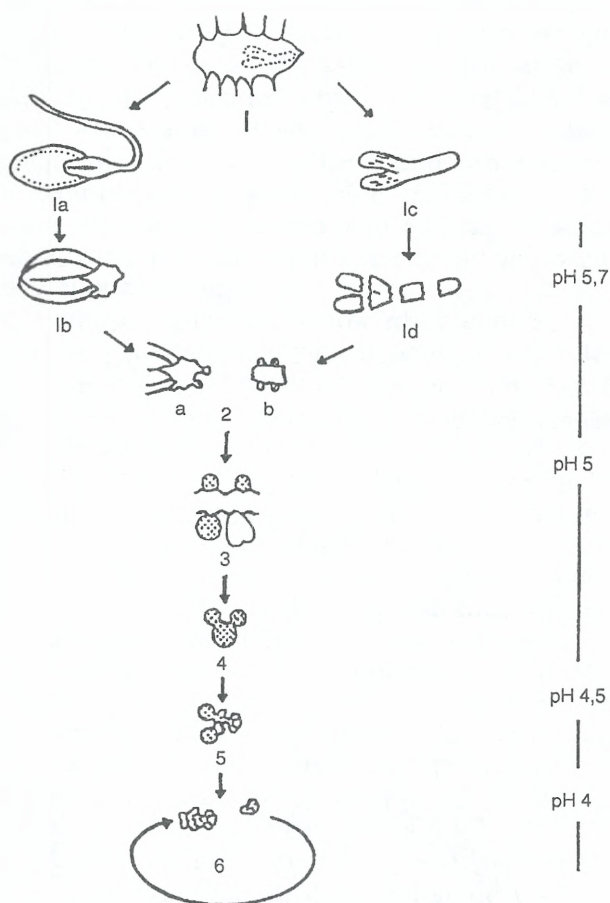
JEFFREYA (1895) „embryogenic mass” i GUERINA (1937) „corps embryogene”, jakim posłużyli się, aby opisać zjawisko poliembryonii u kilku gatunków *Erythronium*, gdzie zygota przekształca się w embriogeniczny wielokomórkowy agregat, z którego formułuje się ostatecznie kilka zarodków. PEM cyklicznie rośnie oraz podlega fragmentacji aż do momentu, w którym usunięcie auksyny lub odpowiednie obniżenie jej poziomu nie zapoczątkuje procesu jego zorganizowanego wzrostu prowadzącego do powstania zarodków z komórek powierzchniowych bogatych w skrobię. Te alternatywne ścieżki rozwojowe zależne od obecności bądź braku syntetycznej auksyny w pożywce zostały schematycznie zilustrowane przez WETHERELLA (1979) (ryc. 3) (za MALEPSZY i WRÓBLEWSKI 1994). Jak dotychczas opublikowano jedną alternatywną do „auksynowej” metodę dotyczącą inicjacji i ustabilizowania u marchwi preglobularnych stadiów proembryonów PGSP (ang. preglobular stage proembryo), na zbuforowanej pożywce wolnej od regulatorów wzrostu o niskim pH przedstawioną na rycinie 4 (SMITH i KRIKORIAN 1990 za WRÓBLEWSKI 1994).



Ryc. 3. Wzrost i różnicowanie w kulturach komórkowych marchwi; tkanka jest namnażana przy ciągłej presji auksyny, powstają w niej primordia — pierwsze stadia rozwojowe zarodków, usunięcie auksyny powoduje ich dalszy rozwój: PEM — masa proembriogeniczna, G — stadium globularne zarodka, H — stadium sercowate zarodka, T — stadium torpedy, P — zarodek dojrzały (WETHERELL 1979 za MALEPSZY i WRÓBLEWSKI 1994).

ROLA AUKSYN W POWSTAWANIU I ROZWOJU ZARODKÓW SOMATYCZNYCH

Duża liczba prac dotyczących biosyntezy auksyn, ich metabolizmu oraz transportu w zarodkach somatycznych pokazuje, jak ważna jest ich rola w indukcji SE oraz kontroli prawidłowego przebiegu procesów morfogenetycznych. Mechanizm indukcji powstawania zarodków z komórek somatycznych nie jest wyjaśniony. Nie mniej powszechnie przyjmuje się, że przy ciągłej obecności



Ryc. 4. Inicjacja i ustabilizowanie u marchwi kultur preglobularnych stadiów proembryonów (PGSP) na zbuforowanej, wolnej od hormonów, półpłynnej pożywce uzupełnionej 1 mM NH_4^+ jako jedynym źródle azotu. Dwie tkanki (pochodzące z dojrzających nasion) [1] były używane jako eksplantaty. Uszkodzone [1c] lub pokrojone [1d] dojrzałe zarodki zygotyczne, a także cała owocnia [1b] po wykiełkowaniu zarodka [1a] mogła być używana do inicjacji globularnych stadiów zarodków somatycznych [2a, 2b] po 4 do 8 tygodni na tej samej pożywce. Zainicjowane, globularne stadia zarodków często rozwijały się dalej [3], ale jeżeli w czasie proliferacji tkanki pH spadło (jako skutek obecności jonów amonowych jako jedynego źródła azotu), to starsze stadia nie rozwijały się i powstawała mieszanina zarodków PGSP [5]. Kolejne pasaże (co 2 tygodnie) na świeżą pożywkę o pH = 4,5, doprowadzały do ustabilizowania kultury złożonej całkowicie z PGSP (SMITH i KRIKORIAN 1990 za WRÓBLEWSKI 1994).

auksyny agregaty PEM syntetyzują wszystkie produkty genów niezbędne do osiągnięcia przez powstający zarodek stadium globularnego. Jednocześnie jednak obecność auksyny blokuje dalszy przebieg embriogenezy. HALPERIN i WETHELLE (1964) oraz BORKID i współautorzy (1986) sugerują, że do osiągnięcia kolejnych stadiów są niezbędne nowe produkty, które mogą być syntetyzowane dopiero po usunięciu auksyny z pożywki. Ponadto po zaindukowaniu procesu embriogenezy oddziaływanie auksyny egzogennej zmienia się o tyle, że zaczyna ona być syntetyzowana także endogennie (MICHALCZUK i współaut. 1992a, 1992b). Wydaje się prawdopodobnym, że oddziaływanie obydwu morfogenetycznie aktywnych substancji może prowadzić do rozregulowania prawidłowo przebiegającego procesu. Kilka prac wykazuje, że niezakłócony transport polarny auksyn w zarodku jest niezbędny do prawidłowego przebiegu morfogenezy (SCHIAVONE i COOKE 1987, LIU i współaut. 1993). Znamienny jest fakt, że zarodki zygotyczne po potraktowaniu inhibitorami transportu auksyn wykazują znacznie mniejszą dezorganizację morfogenezy niż zarodki somatyczne. U pierwszych efektem ich działania na stadium globularne było powstawanie połączonych

liścieni, u drugich natomiast brak wykształcenia osi podłożnej i zupełny brak liścieni. Jedną z interesujących hipotez tłumaczących to zaskakujące zróżnicowanie przedstawił T. COOKE (za ZIMMERMAN 1993). Twierdzi on, że w zarodku zygotycznym w odróżnieniu od somatycznego regulacja morfogenezy odbywa się poprzez dwa mechanizmy: wewnętrzny oraz zewnętrzny związany z oddziaływaniem organizmu matcznego.

MIKROPROPAGACJA

Mikropropagacja jest definiowana jako proces namnażania *in vitro* pąków bocznych na skutek zniesienia dominacji wierzchołkowej oraz regeneracji z nich genetycznie jednorodnych roślin. Pionierskie prace w tej dziedzinie wykonali między innymi Georges Morel, który pracował nad wyprowadzaniem wolnych od wirusów roślin z kultur merystemów pędu; Folke Skoog i Carlos Miller, którzy wyjaśnili rolę odgrywaną przez cytokiny w morfogenezie pędu; zespół Kennetha Timonna, który zajmował się zagadnieniami dominacji wierzchołkowej (za VASIL 1994). W przeciągu ostatnich czterdziestu lat dzięki tym obserwacjom z powodzeniem opracowano wiele wysoce wydajnych i niezawodnych metod szybkiej masowej klonalnej propagacji głównie roślin dwuliściennych. Jako jeden z podstawowych w kulturach *in vitro* proces mikropropagacji jest przedstawiony schematycznie na rycinie 1.

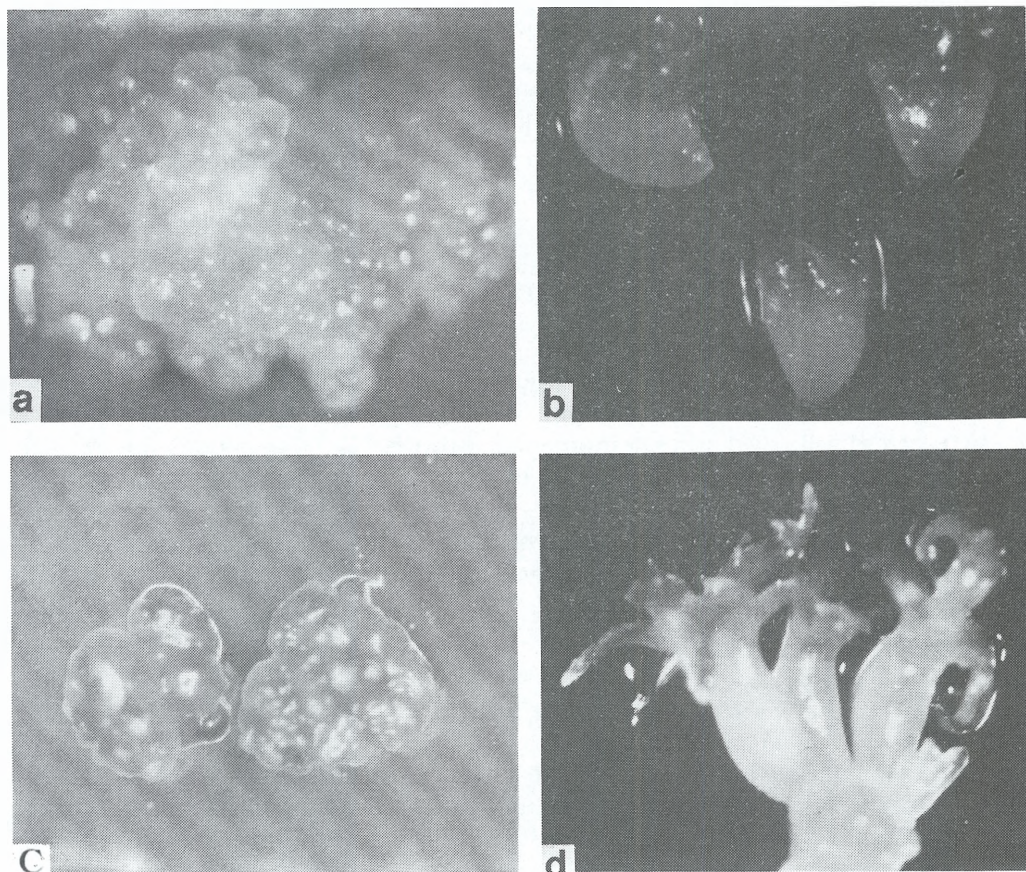
W porównaniu z SE organogeneza pędowa jest znacznie lepiej poznana i kontrolowana w warunkach kultur *in vitro*. Na pewno jeszcze wiele czasu upłynie zanim SE będzie tak powszechnie i skutecznie stosowana, jak mikropropagacja.

Trzeba jednak bezstronnie przyznać, że proces ten jest bez porównania mniej skomplikowany i dlatego nie będzie tak szczegółowo omówiony jak SE. Zasady klonowania *in vitro* i *in vivo* są podobne. Łatwość operowania tą techniką wynika z faktu, że tkanki w żadnym momencie kultury nie przechodzą przez fazę odróżnicowania i wykorzystuje się tutaj naturalną funkcję merystemu wierzchołkowego pędu, którego morfogenetyczna aktywność jest ściśle genetycznie zdefiniowana oraz podlega samoregulacji. Zmienność somaklonalna, która często jest opisywana w kulturach embriogenicznych, w kulturach merystemów jest zjawiskiem bardzo rzadkim.

KULTURA PRIMORDIÓW PĘDOWYCH

Najbardziej zaawansowaną z biotechnologicznego punktu widzenia jest metoda mikropropagacji nazwana kulturą primordiów pędowych (TANAKA i IKEDA 1983). Ze względu na małą popularność tej cennej metody w naszym kraju warto ją krótko scharakteryzować. Kulturę taką zakłada się izolując z pąków wierzchołkowych merystemy z 2–3 primordiami liściowymi. Precyzyjnie pobrane eksplantaty umieszcza się w różnych pożywkach płynnych zawierających auksynę i cytokinę (najczęściej NAA i BAP). Najtrudniejszą fazą kultury jest jej stabilizacja. Prawidłowe dopracowanie wszystkich parametrów, do których należy zaliczyć skład pożywki, objętość płynu i tkanki w probówce, prędkość z jaką obraca się tarcza rotora, czas i intensywność oświetlenia, temperatura, często-

tliwość pasażowania decyduje o powodzeniu. Nieprawidłowo dobrane warunki prowadzą do wytworzenia kalusa bądź zdeformowanych struktur pędowych, prawidłowe zaś stabilizują kulturę w zamkniętym cyklu namnażania się primordiów pędowych. Często, jak na przykład w przypadku ogórka (ryc. 5a, c) (BURZA, dane nieopublikowane), tworzą duże agregaty przypominające strukturą skupiska zarodków globularnych, z tym że posiadają zielone zabarwienie chlorofilu powstającego w tkankach pod wpływem oświetlenia. W trakcie trwania kultury agregaty te podlegają fragmentacji. W takim stanie tkanka może być namnażana latami. Po wyłożeniu na zestalone pożywki szybko dochodzi do powstawania pędów, które są następnie ukorzeniane. Powyżej przedstawiony sposób masowej propagacji został zastosowany z powodzeniem u wielu gatunków roślin dwuliściennych, jednoliściennych i drzewiastych. Podstawowymi jego walorami jest możliwość mechanizacji na poziomie zbliżonym, jak dla SE, oraz wysoki potencjał regeneracyjny niezbędny, na przykład, w procedurze uzyskiwania roślin transgenicznych.



Ryc. 5. a — kalus embriogeniczny *C. sativus* odm. Borszczagowski; b — zarodki somatyczne powstające z kalusa embriogenicznego; c — tkanka merystematyczna powstająca w kulturze primordiów pędowych; d — zarodki somatyczne bezpośrednio powstające z mikroeksplantatów liściowych.

WSPÓŁCZESNE TECHNOLOGIE NAMNAŻANIA ROŚLIN W KULTURACH TKANKOWYCH

Metody kultur tkankowych są obecnie stosowane przez ponad sześćset firm biotechnologicznych na całym świecie, które produkują rocznie ponad pięćset milionów roślin prawie pięćdziesięciu tysięcy odmian (VASIL 1994). Prawie całość produkcji powstaje przy wykorzystaniu technologii mikropropagacji. Nadal poważną barierę rozwojową stanowią wysokie koszty jednostkowe. Ś szczególnie intensywne prace nad automatyzacją mikropropagacji przy wykorzystaniu precyzyjnych robotów wyposażonych w możliwość komputerowej analizy obrazu są prowadzone w Japonii (KURATA i KOZAI 1992). Całkowicie zintegrowany, automatyczny proces mikropropagacji kończący się nawet automatycznym wysadzeniem roślin do ziemi (vitromatic process) został opracowany w Izraelu (LEVIN i współaut. 1988, LEVIN i VASIL 1989).

Przy dużej skali produkcji konieczne jest zastosowanie biofermentorów o znacznych objętościach, co wiąże się z dodatkowymi problemami natury technicznej i biologicznej. AKITA i TAKAYAMA (1994) opracowali technologię produkcji mikrobulw ziemniaka w dziesięciolitrowych fermentorach. Powodzeniem zakończyła się także próba wykorzystania pięćsetlitrowych bioreaktorów do namnażania pędów *Stevia rebaudiana* (AKITA i współaut. 1994). Uzyskano wysoki stopień namnażania wynoszący sto czterdzieści.

PODSUMOWANIE

Proces sterowania morfogenezą roślin *in vitro* nadal pozostaje w sferze badań i eksperymentów w skali laboratoryjnej. W szczególności stwierdzenie to odnosi się do SE. Z drugiej jednak strony dotychczas uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują, że przed tego typu technologiami jest duża przyszłość i należy rozwijać je także w naszym kraju jako integralny element nowoczesnego rolnictwa.

CONTROL OF PLANT MORPHOGENESIS IN CULTURE *IN VITRO*

Summary

Many attempts were made during the last decades to control and modify the life cycle of the plants cultured *in vitro*, both for research and practical purposes. The two essential morphogenetic processes in early plant development which are most important from the biotechnological point of view, are somatic embryogenesis (SE) and shoot organogenesis.

In contrast to animals in which the process of cell differentiation is considered irreversible, it has been demonstrated that SE can be initiated from practically any part of a plant. Auxin plays a fundamental role in formation and development of somatic germs. Disturbances in the course of SE are caused to a large extent by lack of cooperation in this process of the parental organism, which is known to be essential in zygotic embryogenesis.

In comparison with SE, shoot organogenesis is much better understood and controlled under the culture *in vitro* conditions. From the biotechnological point of view, the most advanced propagation method is that called shoot primordia culture. Its main advantages are: the possibility of mechanisation on a level similar to that with SE, and high regeneration potential of plant cells indispensable, e.g., in the procedure of obtaining transgenic plants.

LITERATURA

- AKITA M., SHIGEOKA T., KOIZUMI Y., KAWAMURA M., 1994. *Mass propagation of shoots of Stevia rebaudiana in a large scale bioreactor*. Plant Cell Rep. 13, 180–183.
- AKITA M., TAKAYAMA S., 1994. *Stimulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control*. Plant Cell Rep. 13, 184–187.
- AMMIRATO P. V., 1987. *Organizational events during somatic embryogenesis*. [W:] *Plant Tissue and Cell Culture*. GREEN C. E., SOMERS D. A., HACKETT W. P., BIESBOER D. D., (red). (New York; Alan R. Liss, Inc.), 57–81.
- BORKID C., CHOL J. H., SUNG Z. R., 1986. *Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot*. Plant Physiol. 81, 1143–1146.
- BURZA W., MALEPSZY S., 1995. *Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (Cucumis sativus L.) is free of stable genetic variation*. Plant Breeding 114, 341–345.
- EAPEN S., ABRAHAM V., GERDEMANN M., SCHIEDER O., 1989. *Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and evaluation of plants obtained from mesophyll protoplasts of Brassica juncea*. Annals of Botany 63, 369–372.
- EVANS D. A., SHARP W. R., FLICK C. E., 1981. *Growth and behaviour of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis* [W:] *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. THORPE T. A. (red). Academic Press, New York, 45.
- GUERIN P., 1937. *L'ovule et la graine des Erythronium et des Calochortus*. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 19 (10), 225.
- HACCIUS B., 1978. *Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures*. Phytomorphology 28, 74.
- HALPERIN W., 1966. *Alternative morphogenetic events in cell suspensions*. Am. J. Bot. 53, 443.
- HALPERIN W., 1970. *Embros from somatic plant cells*. [W:] *Control mechanism in the expression of cellular phenotypes*. Int'l Soc. for Cell Biology Symposium no. 9, Padykula H. (red). Academic Press, New York, 169.
- HALPERIN W., WETHERELL D. F., 1964. *Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, Daucus carota*. Am. J. Bot. 512, 274–283.
- HATZOPOULOS P., FONG F., SUNG Z. R., 1990a. *Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene*. Plant Physiol 94, 690–695.
- HERBERLE-BORS E., 1985. *In vitro haploid formation from pollen: a critical review*. Theor. Appl. Genet. 71, 361.
- JEFFREY E. C., 1895. *Polyembryony in Erythronium americanum*. Ann. Bot. 9, 537.
- KITANO H., TAMURA Y., SATOH H., NAGATO Y., 1993. *Hierarchical regulation of organ differentiation during embryogenesis in rice*. Plant J. 3, 607.
- KURATA K., KOZAI T., 1992. *Transplant Production Systems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LEVIN R., GABA V., TAL B., HIRSCH S., DeNOLA D., VASIL I. K., 1988. *Automated plant tissue culture for mass propagation*. Bio/Technology 6, 1035–1040.
- LEVIN R., VASIL I. K., 1989. *Progress in reduction the cost of micropropagation*. IAPTC Newsletter 59, 2–12.
- LIU C. -M., XU Z. -H., CHUA N. -H., 1993. *Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis*. Plant Cell 5, 621–630.
- LOSCHIAVO F., PITTO L., GIULIANO G., TORTI G., NUTI-RONCHI V., MARAZZITI D., VERGARA R., ORSELLI S., TERZI M., 1989. *DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs*. Theor. Appl. Genet. 77, 325.
- MALEPSZY S., WRÓBLEWSKI T., 1994. *Charakterystyka ogólna somatycznej embriogenezy*. [W:] MALEPSZY S. (red.). Post. Biol. Kom. supl. 4, 1–10.
- MERKLE S. A., PARROTT W. A., FLINN B. S., 1995. *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis*. [W:] THORPE T. A. (red). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 155–203.
- MICHALCZUK L., COOKE T. J., COHEN J. D., 1992a. *Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis*. Phytochem. 31, 1097–1103.
- MICHALCZUK L., RIBNICKY D. M., COOKE T. J., COHEN J. D., 1992b. *Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures*. Plant Physiol. 100, 1346–1353.
- REINERT J., 1959. *Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten*. Planta 53, 318.

- SCHIAVONE F. M., COOKE T. J., 1987. *Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors*. *Cell Differ.* 21, 53-62.
- SHARP W. R., EVANS D. A., SONDAHL M. R., 1983. *Aplication of somatic embryogenesis to crop improvement*. [W:] *Plant Tissue Culture*. Proceedinds of the Fifth International Congress of Plant Tissue Culture, Fujiwara A. (red.) Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982, 759.
- SMITH D. L., KRIKORIAN A. D., 1990. *Somatic embryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal*. *Plant Cell Rep.* 9, 34-37.
- SMITH M. K., DREW R. A., 1990. *Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement*. *Aust. J. Plant Physiol.* 17, 267-289.
- TANAKA R., IKEDA H., 1983. *Perennial maintenance of annual Haplopappus gracilis (2n=4) by shoot tip cloning*. *Jpn. J. Genet.*, 58, 65-70.
- THOMAS T. L., 1993. *Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview*. *Plant Cell* 5, 1401-1410.
- THORPE T. A. (ed.) 1995. *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- VASIL I. K., 1994. *Automation of plant propagation*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39, 105-108.
- VERGARA R., VERDE F., PITTO L., LOSCHIAVO F., TERZI M., 1990. *Reversible variations in the methylation pattern of carrot DNA during somatic embryogenesis*. *Plant Cell Rep.* 8, 697.
- VIEITEZ A. M., SAN-JOSE C., VIEITEZ F. J., BALLESTER A., 1991. *Somatic embryogenesis from roots of Camellia japonica plantlets cultured in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 (4), 753-757.
- WETHERELL D. F., 1979. *In vitro embryoid formation in cells derived from somatic plant tissues*. [W:] *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. HUGHES K. W., HENKE R., CONSTANTIN M. (red). Conf. 780411, U. S. Tech. Inf. Serv., Springfield, VA, 102.
- WRÓBLEWSKI T. A., 1994. *Proces somatycznej embriogenezy- charakterystyka szczegółowa*. [W:] MALEPSZY S. (red.). *Post. Biol. Kom. suppl.* 4, 11-32.
- ZIMMERMAN J. L., 1993. *Somatic embryogenesis: a model for earlly development in higher plants*. *The Plant Cell* 5, 1411-1423.