

ROLA CUKROWCÓW W ROŚLINNYCH KULTURACH *IN VITRO*

Role of carbohydrates in plant tissue cultures

Halina BOGUNIA, Lesław PRZYWARA

Summary. Carbohydrates are necessary in living cells as a source of energy and carbon skeletons for biosynthetic processes. In tissue culture carbohydrates are also necessary as osmotic agents. Sucrose has been carbohydrate chosen in most of the experiments. It is assumed that sucrose is the best carbohydrate in culture media because it is the main transport form of carbohydrate in most species. Despite the widespread and successful use of sucrose, other sugars have been reported as being suitable carbon sources for tissue culture of many species. It was found that different patterns of morphogenesis were attributable to the type of carbohydrate and its concentration. In some experimental systems sugar is the key factor which determines the induction and type of morphogenetic phenomena. In this paper, the influence of carbon source on somatic embryogenesis, organogenesis, embryo culture, microspore and anther culture as well as on gynogenetic cultures was discussed. Moreover, some other aspects of tissue cultures connected with carbohydrates (media autoclaving, utilization of carbohydrates by cultured plant tissues) were also briefly presented.

Key words: carbohydrates, plant tissue cultures

Mgr Halina Bogunia, prof. dr hab. Lesław Przywara, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Grodzka 52, 31–044, Kraków

WSTĘP

Cukrowce są nie tylko ważnym źródłem energii dla organizmów żywych, ale również kontrolują wiele ich funkcji życiowych. Ostatnio dowiedziono, że węglowodany działają jako fizjologiczne sygnały powodujące represję lub aktywację genów roślinnych uczestniczących w wielu zasadniczych procesach życiowych, takich jak fotosynteza, oddychanie, synteza i kataliza skrobi i sacharozy, metabolizm azotu, obrona przed patogenami, odpowiedź na zranienie, regulacja cyklu komórkowego, pigmentacja, starzenie się, czy całkowita kataliza protein. Wiele uwagi poświęca się obecnie mechanizmom rozpoznawania i reakcji roślin wyższych na cukrowce (*sugar sensors*) [28, 59] oraz molekularnym badaniom nośników cukrów (transporterów) u roślin [30, 79].

W warunkach kultury *in vitro* cukrowce są jedną z pięciu klas podstawowych substancji niezbędnych do wzrostu i rozwoju [16]. Stanowią one źródło węgla organicznego, wykorzystywane jako materiał energetyczny i substrat do syntez w różnych szlakach metabolicznych, oraz pełnią rolę silnego osmoticum. W hodowanych tkankach roślinnych ciągle dostarczanie cukrowców z pożywki jest niezbędne z powodu zredukowanej – w wyniku niskiej intensywności światła, ograniczonej wymiany gazowej oraz relatywnie wysokiej wilgotności – aktywności fotosyntetycznej [34].

W wielu badaniach dowiedziono, że chemiczna natura cukru dodanego do hodowli stanowi punkt krytyczny w modulacji reakcji morfogenetycznej. W przypadku licznych gatunków najlepszym źródłem węgla dla podtrzymania wzrostu *in vitro* i różnicowania się tkanek jest

sacharoza. Cukier ten jest też najczęściej używanym i najlepiej zbadanym pod tym względem węglowodanem. Sacharoza nie zawsze jest jednak optymalnym źródłem węgla, a w niektórych przypadkach może nawet działać jako inhibitor [17]. Wielokrotnie wykazano, że inne cukrowce mogą skutecznie współzawodniczyć z sacharozą w zdolności warunkowania wzrostu i rozwoju w warunkach *in vitro*.

W niniejszym artykule omówiono niektóre aspekty dotyczące wpływu cukrowców na roślinne kultury *in vitro*. Najwięcej uwagi poświęcono roli cukrowców jako czynnika morfogenicznego. Zagadnienie to jest stosunkowo słabo poznane, a wyniki wielu eksperymentów są często dość niejednoznaczne.

WPLYW AUTOKLAWOWANIA NA CUKROWCE ZAWARTE W POŻYWCIE

Podstawową metodą sterylizacji pożywek jest ich autoklawowanie. Jak wynika z szeregu doniesień, procedura ta nie pozostaje bez wpływu na losy kultury *in vitro*, bowiem pod wpływem wysokiej temperatury następuje degradacja cukrowców i wytwarzanie toksycznych produktów. Autoklawowanie powoduje ponadto hydrolizę cukrowców oraz zmianę pH pożywki.

Owen i in. [57] obserwowali zahamowanie wzrostu hodowli na autoklawowanych pożywkach zawierających fruktozę. Produkty degradacji fruktozy miały wyraźnie toksyczny charakter. Stwierdzono także, że fruktoza ulega silniejszej degradacji w warunkach niskiego odczynu. Dane te wskazują, iż poprzez zwiększanie pH pożywki przed autoklawowaniem można, przynajmniej częściowo, zapobiegać degradacji fruktozy.

Według Romano i in. [65] spadek liczby korzeni w kulturach dębu korkowego, obserwowany na pożywkach zawierających kombinacje różnych węglowodanów, mógł być spowodowany inhibicyjnym oddziaływaniem autoklawowanej fruktozy. Autoklawowana fruktoza i sorbitol nie były także efektywne w promocji proliferacji pędów. Na pożywkach zawierających te cukrowce eksplantaty nie formowały pędów i rosły bardzo słabo. Również glukoza w połączeniu

z autoklawowaną fruktozą była mniej wydajna w regeneracji korzeni i ukorzenianiu pędów, niż sama glukoza lub sacharoza. Wydaje się, że różnice we wrażliwości poszczególnych gatunków na produkty degradacji fruktozy powstające w wyniku autoklawowania, takie jak furfural i hydroksymetylfurfural [11, 25], mogą w istotny sposób wpływać na końcowe rezultaty hodowli.

Sawyer i Hsiao [67] wykazali, że kultury zawieszinowe *Beta vulgaris* utrzymywane w autoklawowanej pożywce zawierającej glukozę, stopniowo tracą chlorofil i przestają rosnąć. Na pożywkach przygotowanych z glukozą autoklawowaną oddzielnie, różnica w tempie konsumpcji tlenu była widoczna w postaci znacznych różnic w ilości suchej masy zawiesziny komórek formowanych w trakcie hodowli.

Zmiana pH pożywki poddanej autoklawowaniu i hydroliza cukrów wywołana wysoką temperaturą były przedmiotem kilku eksperymentów. Owen i in. [57] podają, że poziom pH płynnej pożywki po autoklawowaniu był najwyższy dla pożywki zawierającej sacharozę i progresywnie niższy dla pożywek z maltozą, glukozą i fruktozą. Jak zaobserwowali Lemos i Baker [39], pH pożywki spada zaraz po autoklawowaniu z pH 5,8 do pH 5,7, a następnie obniżanie pH jest kontynuowane do końca szóstego tygodnia kultury do wartości pH 4,6. Stopień i tempo hydrolizy cukrowców pod wpływem autoklawowania zależy w dużym stopniu od rodzaju źródła węgla w pożywce. Hagen i in. [20] podają, że ok. 5% sacharozy zawartej w pożywce hydrolizuje do glukozy i fruktozy. Według innego doniesienia, glukoza hydrolizowana jest w tempie około pięciokrotnie większym niż sacharoza [25].

Podobnie jak w przypadku fruktozy, również autoklawowanie pożywek z sacharozą powoduje uwalnianie pod wpływem wysokiej temperatury toksycznych produktów degradacji cukru negatywnie wpływających na hodowlę. Korzystny wpływ może mieć w takich przypadkach dodanie do pożywki aktywowanego węgla, który jest dobrym absorbentem. Zjawisko takie zaobserwowano np. w kulturach pylników *Zea mays* [7] i mikrospor *Brassica campestris* [19].

ŻUŻYCIE CUKROWCÓW PRZEZ EKSPLANTATY W TRAKCIE HODOWLI

Interesującym zagadnieniem związanym z kulturą *in vitro* tkanek roślinnych jest proces utylizacji cukrowców przez eksplantaty. Z badań nad *Actinidia* [49] wiadomo, że autoklawowanie prowadziło do hydrolizy tylko niewielkiej części inicjalnej zawartości sacharozy w pożywce do glukozy i fruktozy, podczas gdy zawartość sacharozy obniżyła się do 32% po 15 dniach hodowli, 4% po 30 dniach, i 0,08% w końcowym okresie hodowli (po upływie 60 dni). Zmniejszaniu się zawartości sacharozy w pożywce nie towarzyszył równoczesny wzrost ilości tego cukru w eksplantatach. Odnotowano natomiast znaczny wzrost w pożywce zawartości glukozy i fruktozy, który jednak nie równoważył ilości zhydrolizowanej sacharozy. Poziom monosacharydów w pożywce pozostawał stały do 30. dnia hodowli, po czym następował znaczny jego spadek w drugim miesiącu kultury. Autorzy postulują, że sacharoza zawarta w pożywce ulega hydrolizie w wyniku aktywności inwertazy uwalnianej, lub związanej ze ścianą komórkową eksplantatów. Podobnie w kulturach zawieszonych komórek marchwi sacharoza była wstępnie hydrolizowana dzięki aktywności cytoplazmatycznej inwertazy uwalnianej do pożywki przez komórki uszkodzone w czasie pobierania eksplantatów (Ueda i in. 1974, cyt. za [49]). W trakcie przytoczonych tu badań nad *Actinidia*, zaobserwowano ścisłą korelację pomiędzy wzrostem hodowli a utylizacją glukozy, fruktozy i soli mineralnych. Chromatografia gazowa wykonana w pożywce, kalusie i liściach w okresie największego zużycia cukrów ujawniła, że prawie cała glukoza i fruktoza, hydrolizowane i absorbowane w czasie pierwszych 15 dni, były zużywane do podtrzymania wzrostu kultury i tylko niewielka ich część była akumulowana w kalusie. W 30. dniu kultury słabnąca dostępność w pożywce niektórych elementów mineralnych prawdopodobnie spowodowała osłabienie wzrostu eksplantatów, ale pobieranie glukozy i fruktozy było kontynuowane, co prowadziło do akumulacji tych dwóch cukrów w kalusie i liściach. W trakcie ostatniego miesiąca hodowli

zaobserwowano znaczny wzrost zawartości sacharozy w eksplantatach. Proces ten może być wyjaśniony obecnością w komórkach *Actinidia* syntetazy sacharozy, która jest aktywna w syntezie nowej sacharozy. Pożywka może być w dalszym ciągu uważana za główne źródło glukozy i fruktozy dla tej syntezy, ale jej szczególnie udział może pochodzić z fotosyntetycznej aktywności nowo formowanych liści.

Badania prowadzone nad wykorzystaniem węglowodanów w kulturach tkankowych *Annona muricata* [39] pozwoliły stwierdzić, że stężenie sacharozy w pożywce wykazuje spadek z 20 mg g⁻¹ na początku okresu inkubacji do niższego od 5 mg g⁻¹ po 4 tygodniach kultury. Dane te sugerują, że część sacharozy ulega konwersji do heksozy z udziałem inwertazy produkowanej przez tkanki, co uwiadcza się w postaci wzrostu osmolarności i obniżeniu pH pożywki. Część sacharozy zostaje pobrana bezpośrednio przez eksplantaty jako sacharoza lub jako glukoza i fruktoza. Powoduje to wzrost wewnętrznego stężenia sacharozy z 4 mg g⁻¹ do ponad 10 mg g⁻¹ na końcu 4 tygodnia kultury.

Istotnym zagadnieniem we wszystkich omawianych tu badaniach jest kwestia pomiaru stężenia węglowodanów w tkankach roślinnych. Współczesne techniki, takie jak jądrowy rezonans magnetyczny (NMR) sprzężony z CSI (*chemical shift imaging*), oferują możliwość określania stężenia cukru w tkankach roślinnych na nieinwazyjnej drodze, w związku z czym istnieje możliwość wykonywania wielokrotnie powtarzanych pomiarów w tej samej roślinie [77].

ROLA CUKROWCÓW W KULTURACH KALUSA

Literatura na temat kalogenezy, czyli powstawania kalusa, jest bardzo bogata, jednak porównawcze badania nad wpływem różnych cukrów na produkcję i różnicowanie się kalusa są stosunkowo nieliczne i dotyczą niewielu gatunków. U *Linum usitatissimum* kalogeniczna odpowiedź hipokotyli zależy głównie od źródła węgla [50]. Maltoza wydaje się faworyzować kaulogenezę (rozwój pędów przybyszowych), podczas gdy sacharoza stymuluje kalogenezę i ryzogenezę (rozwój korzeni). U soi, na pożywce

zawierającej 5 lub 10 g l⁻¹ sacharozy, pojawiał się niewielki brązowy kalus dokoła peryferycznych części hodowanych liści [32]. Kiedy użyto 4% sacharozy, produkcja kalusa było bardzo słaba i ograniczona jedynie do regionów uszkodzenia tkanek [37]. U *Annona muricata* kalus pojawiał się na eksplantatach hodowanych na pożywkach z sacharozą, glukozą lub galaktozą w stężeniu 5–30 g l⁻¹ [39].

Obszerne badania nad wpływem węglowodanów na kulturę kalusa prowadzili ostatnio Maataoni i in. [44] u *Albizia julibrissina*. Testowane cukrowce podzielone zostały na cztery kategorie pod względem zdolności do indukowania kalogenezy: 1. nie powodujące kalogenicznego efektu, toksyczne dla hodowli – arabinoza, galaktoza; 2. słabo kalogeniczne – ksyloza, laktoza; 3. średnio kalogeniczne – maltoza; 4. wysoce kalogeniczne – sacharoza, glukoza, fruktoza. Badania histologiczne wykazały, że kalus powstały na pożywkach zawierających fruktozę, glukozę i sacharozę był bardzo masywny i całkowicie pokrywał eksplantaty po 20 dniach. Maltoza i laktoza indukowała kalogenezę w mniejszym stopniu. Proliferacja kalusa w obecności ksylozy była bardzo słaba i mogła być obserwowana tylko pod mikroskopem. Dodatkowo wykazano, że odpowiedź kalogeniczna była opóźniona w przypadku mniej kalogenicznych cukrowców. Kalogeniczne cukrowce indukują „kolonie” składające się z izolowanych komórek lub masę komórek zawierających kleiste, śluzowate substancje. Taka organizacja kalusa, zależna od użytego źródła węgla, jest prawdopodobnie związana w dużej części z morfogeniczną potencją eksplantatów korzeniowych *A. julibrissina*. Stwierdzono, że chemiczna natura użytego źródła węgla warunkuje nie tylko tempo formowania się merystemów, ale także późniejszy rozwój pączków, pędów, liści i całych roślin. W przypadku wysoko kalogenicznych cukrowców, badania cytohistologiczne ujawniły amylogenezę jako ciągły proces dotyczący również merystematycznych komórek, w których raczej nie oczekuje się występowania tego zjawiska. W obecności badanych cukrowców najwyraźniej nie następuje zmiana metabolizmu z syntezy skrobi na jej degradację, pra-

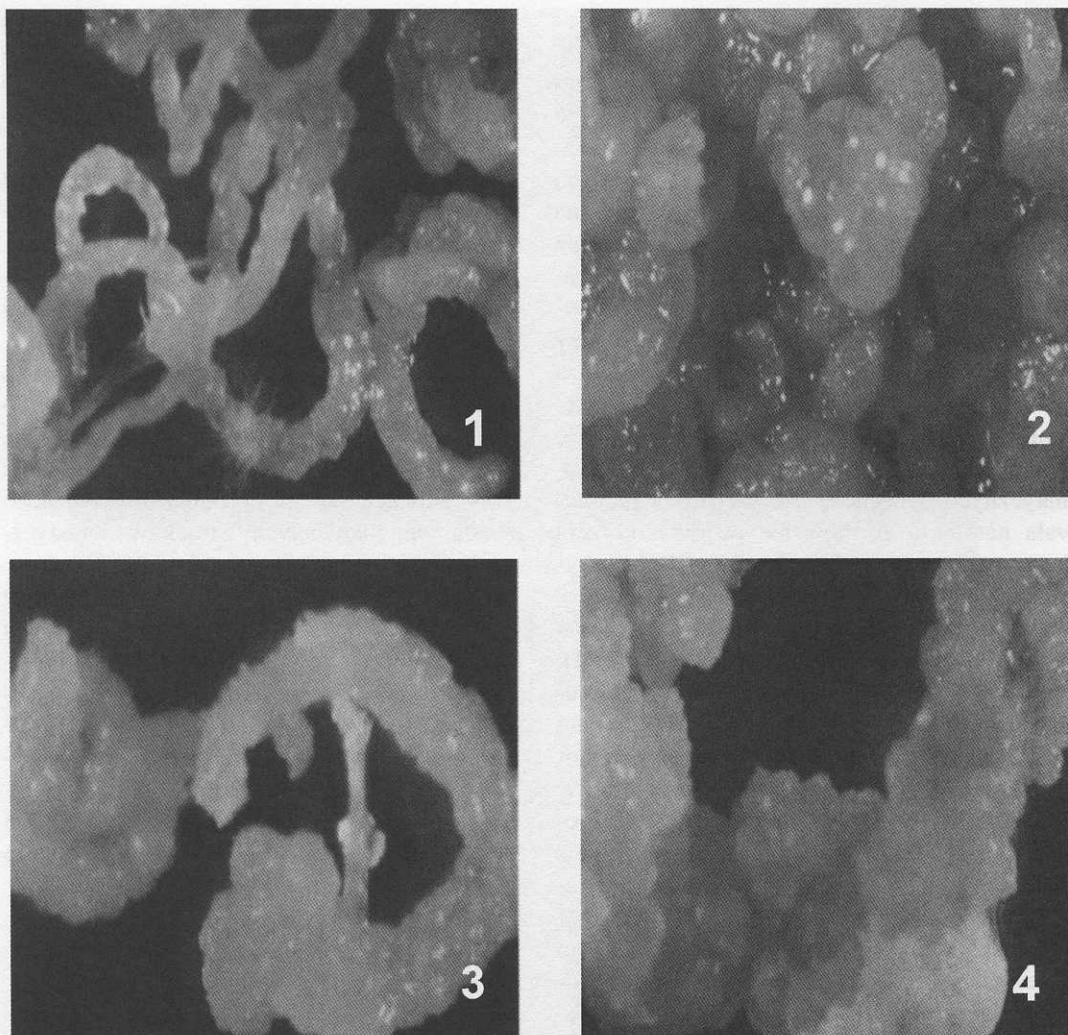
wdopodobnie wskutek represji włączonego systemu enzymatycznego, co może pozbawiać reaktywne komórki energii koniecznej do morfogenezy. Potwierdza to wcześniejsze badania wskazujące, iż nadwyżka w akumulacji skrobi jest związana z końcem procesu wzrostu (literatura u Maataoni i in. [44]). Hipoteza powyższa jest potwierdzona przez fakt, iż użycie słabo kalogenicznych cukrowców indukowało tylko bardzo niską akumulację skrobi, lub nawet powodowało jej zahamowanie.

W prowadzonych aktualnie badaniach nad wpływem różnych cukrowców na indukcję kalusa u *Brassica napus* (Przywara i in., dane niepublikowane), najwyższą ilość tkanki kalusowej uzyskano na pożywkach z 1% i 3% glukozą w obecności auksyny 2,4-D (około ośmiokrotny wzrost świeżej masy w ciągu 6 miesięcy hodowli). Najniższy wzrost zanotowano na pożywkach z rybozą. Pożywki z sacharozą spowodowały czterokrotny przyrost biomasy, podczas gdy w obecności fruktozy masa kalusa zwiększyła się tylko półtorakrotnie. W każdym przypadku użycie cukrowca w stężeniu 10%, niezależnie od jego rodzaju, indukowało najmniejszy przyrost masy kalusa (Ryc. 1).

ROLA CUKROWCÓW W SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZIE

Wpływ cukrowców na somatyczną embriogenezę był przedmiotem wielu interesujących eksperymentów. Jedne z pierwszych badań z tego zakresu dotyczyły rodzaju *Citrus* (por. Ben-Hayyim i Kochba [4]). Galaktoza, laktoza, glicerol i, w mniejszym stopniu, maltoza okazały się cukrowcami lepiej stymulującymi rozwój somatycznych zarodków w przebadanym materiale, niż sacharoza.

Obszerne badania nad wpływem różnych cukrowców na somatyczną embriogenezę u soi prowadził Strickland i in. [72]. Największą liczbę zarodków uzyskano w obecności 3% i 6% maltozy. W niskich stężeniach maltoza warunkowała optymalną morfologię zarodków i ich konwersję. Wykazano ponadto, że przy braku w pożywce jonów amonowych maltoza była całkowicie nieefektywna w stymulacji embrioge-



Ryc. 1. Formowanie kalusa u *Brassica napus*, var. Evita: 1 – na korzeniach, pożywka hodowlana: MS + sacharoza 1% + 2,4-D; 2 – na liścieniach, pożywka hodowlana: MS + ryboza 3% + 2,4-D; 3 – na hipokotylu, pożywka hodowlana: MS + fruktoza 1% + 2,4-D; 4 – na liścieniach, pożywka hodowlana: MS + glukoza 3% + 2,4-D.

Fig. 1. Callus formation in *Brassica napus*, var. Evita: 1 – on roots, culture medium MS + sucrose 1% + 2,4-D; 2 – on cotyledons, culture medium MS + ribose 3% + 2,4-D; 3 – on hypocotyl, culture medium MS + fructose 1% + 2,4-D; 4 – on cotyledons, culture medium MS + glucose 3% + 2,4-D.

nezy. Również i w tych badaniach sacharoza użyta jako pojedyncze źródło węgla okazała się mniej efektywna niż inne cukrowce. Odmienne wyniki przyniosły eksperymenty nad somatyczną embriogenezą u *Trifolium repens* [81]. W przypadku koniczyny właśnie sacharoza była korzystniejszym źródłem węgla niż maltoza.

Rola fruktozy w kulturach embriogennych

jest mniej znana. U *Rosa rugosa* Kunitake i in. [35] zaobserwowali wyższą wydajność fruktozy w indukowaniu somatycznej embriogenezy w porównaniu do sacharozy. Podobną zależność opisano dla kultur embriogennych *Picea mariana* [74, 75]. Natomiast w przypadku *Abies alba* [68] glukoza, sacharoza i galaktoza indukowały rozwój i dojrzewanie somatycznych zarodków,

podczas gdy fruktoza nie miała takiego oddziaływania. Liczne eksperymenty wykazały, że szczególnie ważne znaczenie dla indukcji i przebiegu somatycznej embriogenezy ma stężenie cukrowca w pożywce. Częstotliwość formowania embriogenicznego kalusa z niedojrzałych zarodków *Zea mays* była około 65% wyższa na pożywkach zawierających 12% sacharozę, niż na tej samej pożywce z 3% cukrem [43]. Z badań Emons i in. [12] nad embriogenezą somatyczną w kulturach zawieszinowych kukurydzy wynika, że zarówno mannitol, jak i sacharoza promowały embriogenezę, ale sacharoza w stężeniu 6% wpływała ponadto na akumulację skrobi i optymalne dojrzewanie zarodków somatycznych. Obecność 2% sacharozy indukowała natomiast formowanie pędów i korzeni drogą organogenezy pośredniej. Z kolei, w przypadku *Picea abies* niskie (1%) stężenie sacharozy okazało się optymalne dla inicjacji somatycznej embriogenezy z dojrzałych zarodków [1]. Zarodki somatyczne soi indukowane na 4% sacharozie wykazywały wyraźnie niższy procent kiełkowania w porównaniu z zarodkami pochodzącymi z pożywki zawierającej 0,5%, 1% i 2% sacharozę [37]. Wzrost stężenia sacharozy w pożywce wpływa na polepszenie jakości zarodków somatycznych lucerny [38], co może być związane z odżywczym i osmotycznym oddziaływaniem tego cukru. Dłuższe działanie wysokiego stężenia sacharozy w fazie dojrzewania zarodków ma bardzo podobny efekt do długiej ekspozycji na kwas abscysynowy (ABA) – znacznie obniża jakość zarodków somatycznych i akumulację białek zapasowych. Jest możliwe, że sacharoza oddziałuje poprzez stymulację endogennej syntezy ABA. U *Pisum sativum* wysokie stężenie cukrowców wpływa nie tylko na indukcję somatycznej embriogenezy, ale także na rozwój zarodków somatycznych [42]. Procent zarodków globularnych wzrasta wraz ze wzrostem stężenia monosacharydów. Optymalnym stężeniem cukru dla rozwoju zarodków somatycznych wydaje się być 252 mM.

Bardzo interesujące badania zjawisk morfogenetycznych prowadzone były ostatnio u *Helianthus annuus* [29]. Wykazano, iż kluczowym czynnikiem determinującym morfogenezę w

kulturach niedojrzałych zarodków słonecznika jest stężenie sacharozy w pożywce. Przy stężeniu wynoszącym 87 mM indukowana była organogeneza, natomiast 350 mM stężenie sacharozy indukowało somatyczną embriogenezę. Próby z użyciem pożywek różniących się rodzajem i stężeniem cukrowca oraz ciśnieniem osmotycznym pokazały, iż pewien progowy poziom zawartości cukru w pożywce i ciśnienia osmotycznego były wymagane do indukcji somatycznej embriogenezy, ale nie dla indukcji organogenezy. Rodzaj użytego cukru był tutaj mniej ważny. Cukry odgrywają zatem podwójną rolę w indukcji somatycznej embriogenezy u słonecznika, działając jako czynnik odżywczy i osmotyczny. W warunkach stałego ciśnienia osmotycznego liczba zaindukowanych zarodków somatycznych wzrasta jako funkcja stężenia sacharozy.

Zawartość cukru jest ważnym czynnikiem w dojrzewaniu zarodków somatycznych również u roślin szpilkowych. Zwiększanie poziomu sacharozy przyspiesza dojrzewanie zarodków somatycznych u *Pinus strobus* [14], *Picea mariana* i *P. rubens* [74, 75]. U świerka stężenie wyższe niż 6% (175 mM) hamuje dojrzewanie zarodków somatycznych, podczas gdy 6% (333 mM) poziom fruktozy lub glukozy w pożywce podtrzymuje ich rozwój.

ROLA CUKROWCÓW W ORGANOGENEZIE

Wpływ cukrowców na organogenezę w kulturach *in vitro* jest poznany stosunkowo słabo. Ponadto, większość badań prowadzono na pożywkach uzupełnionych w egzogenne regulatory wzrostu, które mogą zaburzać wewnętrzną równowagę badanego materiału, stąd wyniki są niekiedy trudne do interpretacji.

Z dotychczasowych badań wynika, że znaczenie morfogenetyczne ma zarówno rodzaj, jak i stężenie cukru w pożywce, przy czym różnym cukrom przypisuje się różne wzory morfogenetyczne [47]. I tak, uważa się, że glukoza jest wydajniejsza w regeneracji rozwoju pędów przybyszowych (kaulogenezie), podczas gdy sacharoza w indukcji rozwoju korzeni (ryzogenezie). Kiedy sacharoza lub glukoza były dodane w stężeniu 88 mM, pożywki z glukozą okazały

się lepsze w indukowaniu kaulogenezy z eksplantatów liści u *Solanum melongena*, niż pożywki z sacharozą [53]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad *Phaseolus coccineus* [17]. W optymalnym stężeniu glukoza była prawie trzykrotnie bardziej efektywna niż sacharoza w indukowaniu pośredniej kaulogenezy. Również w przypadku *Rosa* pożywki z glukozą (w stężeniu 111 mM) lepiej nadawały się do stymulowania produkcji pędów, niż pożywki zawierające sacharozę (59 i 117 mM) [24, 25]. Obecność glukozy w pożywce jest bardzo pożądana, ponieważ cukier ten jest prekursorem w biosyntezie mezo-inozytolu, ważnego składnika budulcowego błon komórkowych [83].

Podobnie jak w somatycznej embriogenezie, również w przypadku organogenezy rola fruktozy jest dość niejasna. Stwierdzono np., że cukier ten jest bardzo korzystny w przypadku kultur tkankowych jednych gatunków, a szkodliwy lub mało wydajny dla innych [65]. Być może przyczyną tak różnych wyników jest sposób sterylizacji pożywki. Jak wspomniano wcześniej, autoklawowanie fruktozy wywołuje degradację tego cukru i produkcję toksycznych związków. Wydaje się, że dodanie glukozy i fruktozy do pożywek powinno być korzystne, bowiem jako cukry redukujące zwykle nie transportowane w rurek sitowych, mogą być łatwo pobierane i metabolizowane, stanowiąc dobre źródło węgla w kulturach *in vitro* [82].

Ciągłe dostarczanie węglowodanów z pożywki było konieczne do rozwoju korzeni z fragmentów pędu jabłoni [58]. Na pożywkach pozbawionych źródła węgla korzenie nie formowały się. Uzupełnienie pożywki sacharozą w stężeniu 29–59 mM stymulowało rozwój korzeni oraz formowanie się kalusa. Najwyższa częstotliwość ryzogenezy (100% eksplantatów) wystąpiła na pożywkach zawierających kombinację sacharozy i sorbitolu (59/29 mM) oraz glukozy i sorbitolu (117/59 mM). Wydaje się, że zwiększenie potencjału osmotycznego spowodowane dodaniem sorbitolu, mogło wpłynąć na polepszenie procesu formowania korzeni na fragmentach pędów. Sorbitol okazał się korzystnym źródłem węgla dla indukcji organogenezy również u *Annona muricata*. W przypadku tego

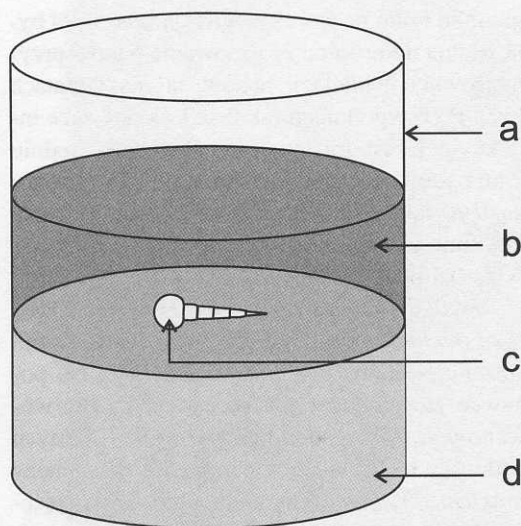
gatunku tylko pożywka zawierająca sorbitol była zdolna do promocji formowania pąków przybyszowych i inicjacji pędów na eksplantatach [39]. Po 6 tygodniach inkubacji na pożywce indukcyjnej sorbitol stymulował rozwój średnio 2,66 pędów na eksplantat, podczas gdy galaktoza użyta jako pojedyncze źródło węgla lub w połączeniu z sorbitolem, indukowała produkcję tylko 0,1 pędu na eksplantat.

Wydajność organogenezy w kulturach *Trifolium michelianum* wzrastała wraz ze wzrostem stężenia sacharozy w pożywce do 4%. Na pożywce zawierającej 8% sacharozę zaobserwowano wyraźny spadek liczby zregenerowanych pędów [33]. Również w przypadku ryzogenezy u *Artemisia annua* optymalne okazało się stężenie 40 i 30 g/l sacharozy [78]. Odwrotne zjawisko zaobserwowano w trakcie badań na *Coffea*. Formowanie organów wystąpiło dopiero na pożywkach o wysokim poziomie sacharozy, aczkolwiek sporadycznie występowało ono także w niższych stężeniach cukru [5].

ROLA CUKRÓW W HODOWLI ZARODKÓW ZYGOTYCZNYCH

Ciśnienie osmotyczne pożywki, regulowane przez cukrowce, odgrywa bardzo ważną rolę w hodowli zarodków zygotycznych *in vitro*. Zarodki niedojrzałe wymagają znacznie wyższego ciśnienia osmotycznego niż zarodki dojrzałe. Zależność ta, odkryta przez Rietsema i in. [64] w trakcie eksperymentów z hodowlą zarodków *Datura stramonium*, została później potwierdzona przez wielu autorów [52, 62, 84].

Odpowiednio dobrane ciśnienie osmotyczne jest szczególnie ważne przy hodowli zarodków w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych. W miarę rozwoju zarodków powinno następować stopniowe obniżanie ciśnienia, podobnie jak to ma miejsce podczas embriogenezy *in situ* [66, 71]. Zbyt drastyczne zmiany ciśnienia powodują z reguły zahamowanie rozwoju zarodków i w konsekwencji ich zamieranie. Specjalny system eksperymentalny umożliwiający hodowlę bardzo młodych zarodków bez konieczności przenoszenia ich na pożywki o obniżonym ciśnieniu osmotycznym opracował Monnier [51, 52].



Ryc. 2. System dwuwarstwowej hodowli zarodków zygotycznych *Brassica napus* L.: a – plastikowy pojemnik hodowlany; b – warstwa pożywki z 6% sacharozy; c – zarodek zatopiony w górnej warstwie pożywki; d – warstwa pożywki bez sacharozy.

Fig. 2. A double-layer culture system for zygotic embryos of *Brassica napus* L.: a – plastic culture tube; b – top layer with 6% sucrose; c – embryo embedded in top layer medium; d – bottom layer medium without sucrose.

Ostatnio zastosowano do hodowli wczesnoglobularnych zarodków *Brassica juncea* [41] oraz *B. napus* [18] metodę hodowli dwuwarstwowej (Ryc. 2), która umożliwiła rozwój zarodków mniejszych niż 50 μm .

Wysoka zawartość cukru w pożywce korzystna dla rozwoju prazarodków, działa na ogół hamująco na rozwój zarodków dojrzałych. Szereg danych na ten temat dotyczy m.in. gatunków z rodzaju *Brassica* [9, 18, 26, 27, 41, 61]. Zarodki rzepaku dojrzewały, gdy stężenie sacharozy w pożywce było stopniowo obniżane z 350 mM do 60 mM [9]. W innych doświadczeniach morfologicznie normalne siewki uzyskano tylko na pożywce zawierającej 1% stężenie sacharozy [18]. Podobne wyniki podano dla zarodków mieszańcowych *B. napus* $\times$ *B. oleracea* [61] oraz wczesno-globularnych zarodków zygotycznych *B. juncea* [41]. Wykazano, że hodowla zarodków rzepaku na płynnej pożywce o wyso-

kim stężeniu sacharozy (13%), powoduje zmiany wewnętrznej struktury komórek i obfitą akumulację skrobi (Rahman, 1993, cyt. za [27]). Odpowiednio dobierając zawartość cukru w pożywce można również regulować rozwój zarodków *Pisum sativum* [8]. Obniżanie stężenia sacharozy do 2% (58 mM) indukowało wcześniejsze kiełkowanie niedojrzałych zarodków, natomiast dodanie cukru hamowało ich rozwój.

Informacje na temat wpływu różnych cukrowców na hodowlę *in vitro* zarodków zygotycznych są nieliczne (por. Zenkteler [84]), przy czym większość danych dotyczy sacharozy.

ROLA CUKROWCÓW W KULTURACH ANDROGENICZNYCH

Wpływ cukrowców na kultury androgeniczne był przedmiotem licznych eksperymentów u wielu gatunków roślin jedno- i dwuliściennych. Jednym z najlepiej poznanych pod tym względem obiektów jest rodzaj *Brassica*. Powszechnie stosowane protokoły hodowli izolowanych mikrospor *B. napus* podają sacharozę (zwykle w stężeniu 8–17%) jako optymalny składnik odżywczy i osmotyczny wymagany dla indukcji haploidalnych zarodków [13]. Także w kulturach pylników *B. campestris* sacharoza okazała się lepszym źródłem węgla, niż mannitol i sorbitol, które nie powodowały indukcji podziałów embriogenicznych [21]. W przypadku mikrospor rzepaku, zamiast sacharozy można również z powodzeniem stosować jako osmoticum glikol polietylenowy o wysokiej masie cząsteczkowej (PEG 4000) [26, 27]. Wykazano, że zarodki rozwijające się z mikrospor na pożywce zawierającej PEG ściśle przypominały zarodki zygotyczne, podczas gdy wysokie stężenie sacharozy (13%) miało wyraźne morfogenetyczny wpływ na rozwój zarodków androgenetycznych. Wysoki poziom sacharozy wpływa korzystnie na hodowlę pylników pszenicy [2, 85] i dyni *Cucurbita pepo* [48]. U dyni pożywki zawierające 90 g l⁻¹ sacharozy indukowały rozwój największej liczby kalusów zdolnych do organogenezy, natomiast największy procent zregenerowanych roślin uzyskano na pożywce wzbogaconej 150 g l⁻¹ sacharozy.

U niektórych gatunków inne niż sacharoza cukrowce mają korzystniejszy wpływ na kultury androgeniczne. Jak podają Scott i Lyne [69], maltoza w stężeniu 175 mM jest optymalnym źródłem węgla dla rozwoju izolowanych mikrospor *Hordeum vulgare*. W obecności sacharozy, glukozy i fruktozy mikrospory zamierały w ciągu trzech pierwszych dni inkubacji. Zamieranie mikrospor następowało również na pożywkach zawierających kombinację maltozy z sacharozą, glukozą i fruktozą. Brak źródła węgla w pożywce powodował śmierć mikrospor dopiero po dłuższym okresie inkubacji. Zdaniem autorów, degeneracja mikrospor nie mogła być spowodowana przez wzrost osmotycum pożywki, ponieważ wysokie stężenia maltozy lub mannitolu nie miały większego wpływu na żywotność komórek. Sacharoza, glukoza i fruktoza oddziałują zatem toksycznie na hodowane komórki. Przedstawione wyniki pokazują również, że izolowane mikrospory reagują odmiennie na warunki kultury niż pylniki, bowiem udało się wcześniej uzyskać embrioidy z pylników inkubowanych na pożywce zawierającej wymienione trzy cukry ([15], Hunter 1988, cyt. za [69]). W kolejnej pracy Scott i Lyne [70] wykazali, że wpływ sacharozy i glukozy zależy od momentu, w którym cukry te były dodane do pożywki, oraz od ich stężenia. Niskie stężenia glukozy (poniżej 2 mM) nie miały szkodliwego wpływu na mikrospory, jednak nie były one zdolne do tworzenia embrioidów. Glukoza w stężeniu 40 mM powodowała śmierć mikrospor, jeśli była dodana do trzeciego dnia inkubacji; dodana później nie hamowała ich rozwoju. W przypadku sacharozy, toksyczny efekt był nieodwracalny już po 6 godzinach inkubacji mikrospor. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że z innych badań [23, 80] wynika, iż sacharoza jest optymalnym źródłem węgla w hodowlach androgenicznych jęczmienia.

Maltoza jest korzystniejszym niż sacharoza źródłem węgla również w przypadku androgenicznych kultur ziemniaka [3], pszenicy [31, 36, 55, 56], lucerny [73], ryżu [40] i *Triticale* [31, 45, 46].

Na koniec należy dodać, że oprócz rodzaju i stężenia cukrowca zawartego w pożywce, istotny wpływ na androgeniczne kultury może mieć

także autoklawowanie pożywki, podczas którego uwalniane są toksyczne produkty degradacji cukrów. Ponadto gwałtowne zmiany w ciśnieniu osmotycznym, spowodowane termiczną degradacją sacharozy do glukozy i fruktozy, mogą zakłócić prawidłowy rozwój embrioidów. Nie zanotowano natomiast większych zmian ciśnienia osmotycznego w przypadku pożywek z maltozą. Raquin [63] udowodnił, że produkty hydrolizy sacharozy mają hamujący wpływ na rozwój androgenetycznych zarodków u *Petunia*. Fruktoza znacząco obniżała procent formowania się embrioidów z mikrospor u pszenicy [54]. Wreszcie należy zaznaczyć, że reakcja na źródło węgla może być w dużym stopniu uzależniona od genotypu, dlatego też można oczekiwać różnych rezultatów, nawet w przypadku tego samego gatunku [76].

ROLA CUKRÓW W GYNOGENEZIE

W przeciwieństwie do hodowli mikrospor i pylników, rola cukrowców w indukcji gynogenezy jest bardzo słabo poznana. Brak w literaturze krytycznych opracowań na ten temat, a nieliczne dane dotyczą głównie buraka. Bossoutrot i Hosemans [6] testowali trzy podstawowe pożywki wzbogacone 1 mg l⁻¹ BA i 3% lub 8% sacharozą. W efekcie uzyskali 0,2% regenerację gynogenicznych roślin. Doctrinal i in. [10] zastosowali w indukcji gynogenezy dwustopniowy proces, w którym stężenie sacharozy było wyższe w pierwszej pożywce indukcyjnej (6–8%) i niższe w pożywce drugiej (3–6%). W doświadczeniu tym zaobserwowano także sezonowy efekt i wpływ genotypu, którego rezultatem była 6–10% częstotliwość indukcji gynogenezy.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że podobnie jak w hodowli niedojrzałych zarodków i bardzo młodych załączków izolowanych tuż po zapłodnieniu, zawierających zygotę lub kilkukomórkowe prazarodki [22, 60], do hodowli niezapłodnionych załączków konieczne jest stosowanie pożywek o wysokim ciśnieniu osmotycznym. Najlepsze wyniki uzyskuje się stosując sacharozę; inne węglowodany, jak np. maltoza, wydają się być mniej efektywne w tym przypadku. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ARNOLD von S., HAKMAN I. 1986. Effect of sucrose on initiation of embryogenic cultures from mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol.* **122**: 261-265.
- [2] BALL S., ZHOU H., KONZAK C. F. 1992. Sucrose concentration and its relationship to anther culture in wheat. *Crop Sci.* **32**: 149-154.
- [3] BATTY N., DANWELL J. M. 1989. Effect of carbohydrate source on the response of potato anthers in culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **18**: 221-226.
- [4] BEN-HAYYIM G., NEUMANN H. 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus callus* cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**: 331-337.
- [5] BERTRAND-DESRUNAIS A., NOIROT M., CHARRIER A. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 2: Influences of reduced concentration of sucrose and low temperature. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **31**: 105-110.
- [6] BOSSOUTROT D., HOSEMANS D. 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L. from *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Rep.* **4**: 300-303.
- [7] BUTER B., PESCIATELLI S. M., BERGER K., STAMP P. 1993. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Rep.* **13**: 79-82.
- [8] COOK S. K., ADAMS H., HEDLEY C. L., AMBROSE M. J., WANG T. L. 1988. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. VII. Embryo development and precocious germination *in vitro*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **14**: 89-101.
- [9] CROUCH M., SUSSEX I. M. 1981. Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* **153**: 64-74.
- [10] DOCTRINAL M., SANGWAN R. S., SANGWAN-NORREEL B. S. 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell, Tiss. Org. Culture.* **17**: 1-12.
- [11] DRUART P., De WULF O. 1993. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **21**: 97-99.
- [12] EMONS A. M. C., SAMALLO-DROPPERS A., VAN DER TOORN C. 1993. The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberelic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *J. Plant Physiol.* **142**: 597-604.
- [13] FERRIE A. M. R., PALMER C. E., KELLER W. A. 1995. *In vitro* embryogenesis in plants. W: T. A. THORPE (red.) *Plant Embryogenesis*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, s. 309-344.
- [14] FINNER J. J., KRIEBEL H. B., BEEWAR M. R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* **8**: 203-206.
- [15] FINNIE S. J., POWELL W., DYER A. F. 1989. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.* **103**: 110-118.
- [16] GAMBORG O. L., MURASHIGE T., THORPE T. A., VASIL I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* **12**: 473-478.
- [17] GENGA A., ALLAVENA A. 1991. Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **27**: 189-196.
- [18] GÓRALSKI G., PRZYWARA L. 1998. *In vitro* culture of early globular stage embryos of *Brassica napus* L. *Acta Biol. Cracov. series Bot.* **40**: 53-60.
- [19] GUO Y.-D., PULLI S. 1995. *In vitro* pollen culture and the regeneration of *Brassica campestris* L. plants. *Agric. Sci. in Finland* **4**: 513-518.
- [20] HAGEN S. R., MUNETA P., AUGUSTIN J., LETOUMEAU D. 1991. Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **25**: 45-48.
- [21] HAMAOKA Y., FUJITA Y., IWAI S. 1991. Effects of temperature on mode of pollen development in anther culture. *Physiol. Plant.* **82**: 67-72.
- [22] HAN K., STEPHENS L. C. 1992. Carbohydrate and nitrogen sources affect respectively *in vitro* germination of immature ovules and early seedling growth of *Impatiens platypetala* Lindl. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **31**: 211-214.
- [23] HOEKSTRA S., van ZIJDERVELD M. H., HEIDEKAMP F., VAN DER MARK F. 1993. Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep.* **12**: 661-665.
- [24] HSIA CH., KORBAN S. S. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **44**: 1-6.
- [25] HSIAO K. C., BORNMAN C. H. 1989. Cyanide-inhibited oxygen consumption in autoclaved culture medium containing sugars. *Plant Cell Rep.* **8**: 90-92.
- [26] ILIĆ-GRUBOR K., ATTREE S. M., FOWKE L. C. 1998. Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. *Plant Cell Rep.* **17**: 329-333.
- [27] ILIĆ-GRUBOR K., ATTREE S. M., FOWKE L. C. 1998. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. *Ann. Bot.* **82**: 157-65.
- [28] JANG J. Ch., LEON P., ZHOU L., SHEEN J. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell* **9**: 5-19.
- [29] JEANNIN G., BRONNER R., HAHNE G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.), cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Rep.* **15**: 200-204.
- [30] KAMMERER B., FISCHER K., HILPERT B., SCHUBERT S., GUTENSOHN M., WEBER A., FLUGGE U. J. 1998. Molecular characterization of a carbon transporter in plasmids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phos-

- phate/phosphate antiporter. *The Plant Cell* **10**: 105–117.
- [31] KARSAI Z., BEDO Z., HAYES P. M. 1994. Effect of induction medium, pH, and maltose, concentration on *in vitro* androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **39**: 49–53.
- [32] KOMATSUDA T., KANEKO K., OKA S. 1991. Genotype x sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. *Crop Sci.* **31**: 333–337.
- [33] KONIECZNY R. 1996. Regeneracja roślin u wybranych przedstawicieli *Trifolium*. Praca doktorska wykonana w Instytucie Botaniki UJ. Kraków.
- [34] KOZAI T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. W: P. C. DEBERGH, R. H. ZIMMERMAN (red.), *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 447–469.
- [35] KUNITAKE H., IMAMIZO H., MIH M. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). *Plant Sci.* **90**: 187–194.
- [36] LAST D. I., BRETTELL R. I. S. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* **9**: 14–16.
- [37] LAZZERI P. A., HILDEBRAND D. F., SUNEGA J., WILLIAMS E. G., COLLINS G. B. 1988. Soybean somatic embryogenesis interaction between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep.* **7**: 517–520.
- [38] LECOUEUX C. G., LAI F. M., MCKESSIE B. D. 1993. Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress. *Plant Sci.* **94**: 207–213.
- [39] LEMOS E. E. P., BAKER D. A. 1998. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. *Plant Growth Reg.* **25**: 105–112.
- [40] LENTINI Z., REYES P., MARTINEZ C. P., ROCA W. M. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Sci.* **110**: 127–138.
- [41] LIU C.-M., XU Z.-H., CHUA N.-H. 1993. Proembryo culture: *in vitro* development of early globular-stage zygotic embryos from *Brassica juncea*. *The Plant J.* **3**: 291–300.
- [42] LOISEAU J., MARCHE C., Le Deunff Y. 1995. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **41**: 267–275.
- [43] LU C., VASIL V., VASIL I. K. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Gen.* **66**: 285–289.
- [44] MAATAONI M. E., ESPAGNAC H., JABER B., ALOUSO-LOPEZ A. 1998. Regulation of *in vitro* callogenesis androgenesis from *Albizzia* root explants by carbohydrate source modifications. *J. Plant Physiol.* **152**: 494–501.
- [45] MARCINIAK K., BANASZAK Z., BRYKCYŃSKA L. 1997. Wpływ pożywek P2 i C17 oraz maltozy i sacharozy na wydajność androgenyzy u pszenicy. *Biul. Inst. Hod. i Aklimat. Rośl.* **204**: 43–47.
- [46] MARCINIAK K., BANASZAK Z., WĘDZONY M. 1998. Effect of genotype, medium and sugar on triticale (*x Triticosecale* Wittm.) anther culture response. *Cer. Res. Comm.* **26**: 145–151.
- [47] MARINO G., BERTAZZA G., MAGNANINI E., ALTAN A. D. 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **34**: 235–244.
- [48] METWALLY E. J., MOUSTAFA S. A., EL-SAWY B. J., SKALABY T. A. 1998. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **52**: 171–176.
- [49] MEZZETTI B., COUTE L. S., ROSATI P. 1991. *Actinidia delicosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrate utilization by explants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **26**: 153–160.
- [50] MILLAM S., DAVIDSON D., POWELL W. 1992. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **28**: 163–166.
- [51] MONNIER M. 1978. Culture of zygotic embryos. W: T. A. THORPE (red.), *Frontiers of Plant Tissue Culture*. University of Calgary Press, Calgary, s. 227–286.
- [52] MONNIER M. 1995. Culture of zygotic embryos. W: T. A. Thorpe (red.), *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 117–153.
- [53] MUKHERJEE S. K., RATHINASABAPATHI B., GUPTA N. 1991. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **25**: 13–16.
- [54] NAVARRO-ALVAREZ W., BAENZIGER P. S., ESKRIDGE K. M., SHELTON D. R., GUSTAFSON V. D., HUGO M. 1994. Effect of sugars in wheat anther culture media. *Plant Breed.* **112**: 53–62.
- [55] ORSHINSKY B. R., MCGREGOR L. J., JOHNSON G. I. E., HUCL P., KARTHA K. K. 1990. Improved embryo induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant Cell Rep.* **9**: 365–369.
- [56] OTANI M., SHIJIMADA T. 1993. High frequency of pollen embryo formation in *Triticum aestivum* on maltose containing medium. *Cer. Res. Comm.* **21**: 11–15.
- [57] OWEN H. R., WENGERD D., MILLER A. R. 1991. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal and medium storage method. *Plant Cell Rep.* **10**: 583–586.
- [58] PAWLICKI N., WELANDER M. 1995. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Sci.* **106**: 167–176.
- [59] PERATA P., MATSUKURA Ch. VERNIERI P., YAMAGUCHI J. 1997. Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *The Plant Cell* **9**: 2197–2208.
- [60] PRZYWARA L., POPIELARSKA M. 1997. *In ovulo* zygote and proembryo culture of *Brassica napus* L. Abstracts VIII Conference of Plant Embryologists, 16–18 September 1997, Gdańsk, Poland, s. 74.
- [61] QUAZI M. H. 1988. Interspecific hybrids between

- Brassica napus* L. and *Brassica oleracea* L. developed by embryo culture. *Theor. Appl. Gen.* **75**: 309–318.
- [62] RAGHAVAN V. 1980. Embryo culture. *Int. Rev. Cyt. Suppl.* **11B**: 209–240.
- [63] RAQUIN C. 1983. Utilisation of different sugars of carbon sources for *in vitro* anther culture of *Petunia*. *Z. f. Pflanzenphysiol.* **453**–457.
- [64] RIETSEMA J., SATINA S., BLAKESLEE A. F. 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. *Am. J. Bot.* **40**: 538–545.
- [65] ROMANO A., NORONHA C., MARTINS-LONCAO M. A. 1995. Role of carbohydrate in micropropagation of cork oak. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **40**: 159–167.
- [66] RYCZKOWSKI M. 1964. Sugars and osmotic value of the sap surrounding the embryo in developing ovules (dicotyledonous perennial plants). *Acta Soc. Bot. Pol.* **33**: 397–406.
- [67] SAWYER H., HSIAO K. CH. 1992. Effects of autoclave-induced carbohydrate hydrolysis on the growth of *Beta vulgaris* cells in suspension. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **31**: 81–86.
- [68] SCHULLER A., REUTHER G. 1993. Response of *Abies alba* embryonal suspensor mass to various carbohydrate treatment. *Plant Cell Rep.* **12**: 199–202.
- [69] SCOTT P., LYNE R. L. 1994. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **36**: 129–133.
- [70] SCOTT P., LYNE R. L. 1994. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effect of sucrose and glucose. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **37**: 61–65.
- [71] SMITH J. G. 1973. Embryo development in *Phaseolus vulgaris*. II. Analysis of selected inorganic ions, ammonia, organic acids, amino acids and sugars in the endosperm liquid. *Plant Physiol.* **51**: 454–458.
- [72] STRICKLAND S. G., NICHOL J. W., MCCALL C. M., STUART D. A. 1987. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **48**: 113–121.
- [73] TANNER G. J., PICCIRILLI M., MOORE A. E., LARKIN P. J., ARCIONI S. 1990. Initiation of non-physiological division and manipulation of developmental pathway in cultured microspores of *Medicago* sp. *Protoplasma* **158**: 165–175.
- [74] TREMBLAY L., TREMBLAY F. M. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B. S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **27**: 95–101.
- [75] TREMBLAY L., TREMBLAY F. M. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **42**: 39–46.
- [76] TROTTER M. C., COLLIN J., COMENA A. 1993. Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **35**: 59–67.
- [77] VERSCHT J., KALUSCHE B., KOHLER J., KOCHENBERGER W., METZLER A., HAASE A., KOMOR E. 1998. The kinetics of sucrose concentration in the phloem of individual vascular bundles of the *Ricinus communis* seedling measured by nuclear magnetic resonance microimaging. *Planta* **205**: 132–139.
- [78] WEATHERS P. J., HEMMAVANK D. D., WALCERZ D. B., CHEETHAM R. D., SMITH T. C. 1997. Interactive effect of nitrate and phosphate salts, sucrose and innoculum culture age on growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **33**: 306–312.
- [79] WEBER H., BORISJUK L., HEIM U., SANER N., WOBUS U. 1997. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *The Plant Cell* **9**: 895–908.
- [80] WEI Z. M., KYO M., HARADA H. 1986. Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. 'Sabarlis'. *Theor. Appl. Genet.* **72**: 252–255.
- [81] WEISSINGER II A. K., PARROTT W. A. 1993. Repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in white clover. *Plant Cell Rep.* **12**: 125–128.
- [82] WELANDER M., WELANDER N. T., BRACKMAN A-S. 1989. Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *J. Hort. Sci.* **64**: 361–366.
- [83] WRÓBLEWSKI T. 1994. Proces somatycznej embriogenezy – charakterystyka szczegółowa. *Post. Biol. Kom.* **21**, supl. 4: 11–32.
- [84] ZENKTELER M. (red.). 1984. Hodowla komórek i tkanek roślinnych. PWN. Warszawa.
- [85] ZHOU H., ZHENG Y., KONZAK C. F. 1991. Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* **10**: 63–66.