

ZMIENNOŚĆ W KULTURACH *IN VITRO*

Variability in *in vitro* cultures

Bożena BORKOWSKA

Summary. Plant tissue culture and regenerants of whole plants from cultured cells, tissues and organs is essentially an extension of vegetative propagation and should result in clonal uniformity. On the other hand variations met in tissue culture system represent a new source of variability and therefore constitutes a powerful tool for the breeder, especially in combination with mutagenic treatments and selection *in vitro*.

The causes of variations can be separated into three sections 1. somaclonal variation, 2. epigenic variation and 3. those caused by variation that existed in the source plants e.g. chimeras. The main difference between epigenic and somaclonal variation is that somaclonal variation is transmitted during meiosis, whereas epigenic variation is not. Epigenic variation is reversible during the life of plant.

Key words: epigenic, somaclonal variation, chimeras, true-to-type

Prof. dr hab. Bożena Borkowska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, 96–100 Skierniewice

WSTĘP

Kultury *in vitro* są z jednej strony źródłem olbrzymich nadziei na rozwiązanie wielu problemów i wprowadzania nowych technologii, z drugiej jednak strony wzbudzają niepokój, często wręcz dezaprobatę. Powodem negatywnych opinii o kulturach jest dosyć szeroko rozpowszechniona opinia, że są one źródłem niekontrolowanej zmienności. W artykule tym chcę podjąć próbę wyjaśnienia, jak jest naprawdę ze zmiennością w kulturach *in vitro* (w szerokim znaczeniu pojęcia „kultur”) i na ile sądy powtarzane na temat niekontrolowanej zmienności są uzasadnione.

Terminy „kultury *in vitro*” lub „kultury tkankowe” są pojęciem bardzo szerokim, obejmującym tak odległe od siebie układy biologiczne jak: kultury protoplastów, kultury komórkowe, kalusa, zarodków somatycznych i wreszcie organów – głównie pędów. We wszystkich tych układach mamy do czynienia z żywym materiałem biologicznym, a więc zmienność musi wy-

stępować tak jak w całym świecie ożywionym. Należy natomiast zastanowić się i ocenić: 1. jaki charakter ma zmienność występująca w kulturach tkankowych; 2. z jaką występuje częstotliwością oraz 3. czy mamy wpływ na jej występowanie.

RODZAJE ZMIENNOŚCI

Obecnie funkcjonują dwa terminy określające zmienność: zmienność somaklonalna oraz epigeniczna (czasem używany jest termin „habituation”). Wyróżniana jest również zmienność pozorna.

Zmienność somaklonalna – pojęcie to zostało wprowadzone przez Larkina i Scowcrofta [11] dla określenia zmian genetycznych powstałych w komórkach somatycznych rozmnażanych wegetatywnie, a nie w rozmnażaniu generatywnym. Są to mutacje stabilne, przenoszone na potomstwo na drodze rozmnażania płciowego [14, 18]. Wielokrotnie stwierdzano, że mutacje występujące w układach *in vitro* mają taki

sam charakter jak mutacje powstałe w warunkach naturalnych. Mogą więc to być zmiany w liczbie chromosomów prowadzące do powstania poliploidów i aneuploidów; w strukturze chromosomów najczęściej spotykane to translokacje i delecje; zmiany w sekwencji DNA mutacje punktowe, zmiany w metylacji DNA i inne szeroko znane, szczególnie w pracach genetycznych [8, 12, 14, 21].

Preil [18] w konkluzji badań przeprowadzanych nad występowaniem zmienności somaklonalnej stwierdza, że jest nieprawdopodobne aby w kulturach tkankowych mogły być indukowane biologiczne procesy, które uruchamiałyby inne zmiany genetyczne niż zachodzące w całych organizmach roślinnych.

Zmienność epigeniczna (habituation) – ten typ zmienności jest często obserwowany na roślinach otrzymanych metodą mikrorozmnażania. Zmienność epigeniczna objawia się głównie zmianą kształtu, koloru i wielkości liści. Mogą wystąpić również okresowe zmiany w szybkości wzrostu (opóźnienie lub przyspieszenie wzrostu). Często obserwuje się zwiększoną zdolność do wytwarzania systemu korzeniowego. Niektóre rośliny, np. truskawki wykazują tendencje do nadmiernego zawiązywania pąków kwiatowych. Ten typ zmienności występuje tylko okresowo, a opisane objawy są typową reakcją fizjologiczną na warunki istniejące w kulturach *in vitro*. Zmienność epigeniczna różni się tym od zmienności somaklonalnej, że nie jest dziedziczona na drodze rozmnażania płciowego, a jej morfologiczne objawy zanikają stosunkowo szybko [6, 8, 15, 21].

Zmienność pozorna – często się zdarza, że rośliny otrzymane metodą *in vitro* różnią się w sposób istotny od rośliny wyjściowej. Różnice nie są jednak spowodowane zaistnieniem zmienności w czasie prowadzenia kultur, a jedynie ujawnieniem istniejących wcześniej (w roślinie macierzystej) różnych genotypów. Zjawisko to występuje w przypadku założenia kultur z tkanek, które są chimerami. Chimery, czyli rośliny posiadające więcej niż jeden genotyp, występują powszechnie. Zróznicowany materiał genetyczny użyty do założenia kultur musi dać rośliny różniące się między sobą [21]. Przykładem

mogą być kultury zakładane z pąkowego mutantu (sportu) jabłoni odmiany *Delicious*, charakteryzującego się obecnością na drzewie krótkopędów. Rośliny otrzymane metodą mikrorozmnażania nie są typem krótkopędowym [8]. Nie jest to jednak wynikiem zmienności (jak często się sugeruje, dając przykład nieprzydatności mikrorozmnażania dla sadownictwa), tylko zakładania kultur z tkanki, która nie posiada genotypu warunkującego krótkopędowość. Otrzymanie roślin różniących się od rośliny macierzystej może być również wynikiem uaktywnienia genów. W czasie całego życia organizmu tylko niewielka pula genów ujawnia swoje istnienie. W kulturach *in vitro* istnieją warunki sprzyjające ekspresji genów. Otrzymanie roślin różniących się od rośliny wyjściowej nie jest więc zawsze wynikiem powstania mutacji.

CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA MUTACJI

Częstotliwość występowania zmienności jest związana z rodzajem prowadzonych kultur, z pochodzeniem materiału biologicznego znajdującego się w kulturach i z zastosowaną metodą. W najprostszym systemie z punktu widzenia biologicznego, a więc w kulturach protoplasm, kulturach komórkowych i kalusa, zmienność somaklonalna występuje z wysoką częstotliwością. Również zarodki somatyczne, czyli struktury powstałe z komórek somatycznych mające budowę podobną do zarodków zygocynnych, są źródłem dużej zmienności. Ten typ kultur jest wykorzystywany do prac hodowlanych i selekcyjnych [7, 13]. Występująca zmienność spontaniczna jest wysoce pożądana, jak również wprowadzane są traktowania indukujące zmienność (zwiększające jej częstotliwość).

W przeciwieństwie do celów hodowlanych, występowanie zmienności w mikrorozmnażaniu (kultury pędowe) jest niekorzystne. Jest to zagadnienie budzące wiele emocji, dzielące ludzi zainteresowanych mikrorozmnażaniem na zwolenników i przeciwników tej metody.

WYSTĘPOWANIE ZMIENNOŚCI W KULTURACH PĘDOWYCH (MIKROROZMNAŻANIE)

W trakcie prowadzenia kultur istnieje wiele zagrożeń, które mogą spowodować wystąpienie różnorodnych mutacji. Równocześnie jednak, znając źródła zagrożeń można tak poprowadzić kultury, aby częstotliwość mutacji była na poziomie naturalnej zmienności [19]. Największym zagrożeniem dla stabilności cech jest obecność w pożywce regulatorów wzrostu. Jest rzeczą oczywistą, że do prawidłowego różnicowania hodowanej tkanki niezbędne są auksyny i cytokininy. Rodzaj regulatora, jak i jego stężenie muszą być jednak dobrane niezwykle precyzyjnie. Z auksyn najbardziej niebezpieczna jest 2,4-D (kwas 2,4 dichloro-fenoksyoctowy), uznawana wręcz za czynnik mutageny [17], stymuluje bowiem syntezę DNA co w końcowym efekcie prowadzi do endoreplikacji i fragmentacji jądra [20, 21]. W związku z tym 2,4-D stosuje się niezwykle rzadko w mikrorozmnażaniu. Cytokininy, które stymulują podziały komórkowe również mogą być czynnikiem mutagenym. Dzieje się to wtedy, gdy podziały komórkowe występują ze zbyt dużą szybkością i gdy występuje niekontrolowane różnicowanie komórek. Przy zbyt wysokim stężeniu cytokinin w stosunku do auksyn powstaje tkanka kalusowa, której komórki bardzo łatwo mutują (najczęściej zmienia się ich ploidalność). Jest bardzo wysokie prawdopodobieństwo, że pędy wytworzone z komórek kalusa nie będą zgodne z oczekiwanym typem [10, 16, 20]. Uważa się, że auksyny i cytokininy powinny być stosowane w stężeniu możliwie niskim. Istnieje również pogląd, że dla niektórych gatunków jest najlepiej, gdy stosunek molowy obu regulatorów jest równy [3, 15, 21]. Najczęściej w fazie namnażania stężenie auksyny jest znacznie niższe od stężenia cytokininy, natomiast w fazie ukorzeniania cytokinina jest w ogóle eliminowana, a auksyna jest stosowana w wysokim stężeniu (1 mg/l lub więcej). Oprócz auksyn i cytokinin również poliaminy, które czasem są stosowane w kulturach *in vitro* mogą stymulować zmienność [9].

Regulatory wzrostu są najaktywniejszym czynnikiem mogącym wywołać zmienność, ale

nie należy lekceważyć również innych związków chemicznych znajdujących się w pożywce. Uogólniając, można powiedzieć, że każdy związek chemiczny (łącznie z pokarmowymi) podany w zbyt dużej koncentracji może spowodować destabilizację cech.

Niezmiernie ważnym czynnikiem, który może decydować o wystąpieniu zmienności jest czas. Wiele danych wskazuje, że pojawienie się zmienności jest wprost proporcjonalne do czasu prowadzenia kultur (liczby pasaży), licząc od ich założenia. Z tego względu poleca się, aby przy mikrorozmnażaniu ograniczyć się do kilku czy kilkunastu pasaży [2, 3]. Dane Borkowskiej [1] wskazują jednak, że nie zawsze czas przebywania w kulturze *in vitro* jest czynnikiem destabilizującym cechy pędów, a następnie otrzymanych roślin. Współczynnik namnażania i ukorzeniania kultur odmian wiśni prowadzonych przez wiele lat (od 0.5 roku do 5 lat) pozostawał na podobnym poziomie. Również drzewka wiśni otrzymane z tych kultur i posadzone do sadu nie wykazują zwiększonej zmienności. Rok 1994 był czwartym rokiem ich owocowania, a szóstym po wyjęciu roślin ze szkła. Nie zaobserwowano żadnych cech zarówno drzewek jak i owoców, które wskazywałyby, że w czasie wieloletniego przebywania w kulturze *in vitro* wystąpiły mutacje. Może to wskazywać na wysoką stabilność genetyczną wiśni. Również truskawka jest uznawana za roślinę stabilną genetycznie [2, 16, 17]. Mimo to zaleca się, aby przy mikrorozmnażaniu nie przekraczać 15 pasaży.

W kulturach pędowych wyróżnia się 2 typy pędów: kątowe i przybyszowe. Pędy kątowe powstają z nieodróżnicowanej tkanki merystematycznej. Powstały pąk, a następnie wyrastający pęd zawiera dokładnie ten sam genotyp co tkanka macierzysta. Uważa się, że rośliny pochodzące z pędów kątowych są wiernym odbiciem rośliny wyjściowej, a prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji jest minimalne [5, 21]. Zupełnie inaczej wygląda sytuacja przy powstawaniu pędów przybyszowych. Pąki a następnie pędy przybyszowe powstają z komórek, które już są zróżnicowane, np. z komórek epidermy lub z komórek położonych subepidermalnie. Pędy przybyszowe mogą również powstawać z tkanki

kalusowej. Kalus jest tkanką niestabilną genetycznie i jego komórki mogą wykazywać różny stopień ploidalności, a więc genotyp pędu będzie taki jak danej komórki z której powstał, a nie jak rośliny wyjściowej [19, 20]. Autorzy zajmujący się mikrorozmnażaniem uważają więc, że pobieranie do ukorzenia wyłącznie pędów kątowych zapewnia otrzymanie roślin o takich samych cechach jak roślina wyjściowa.

ZASTOSOWANIE MIKROROZMNAŻANIA

Rozmnażanie roślin ogrodniczych metodą kultur *in vitro* wprowadzono najpierw dla roślin kwiatarskich, następnie warzywniczych, na końcu rozszerzono jej stosowanie na rośliny sadownicze. Obecnie metoda *in vitro* jest opracowana i stosowana dla bardzo wielu gatunków roślin. W Polsce mikrorozmnażanie ciągle napotyka na olbrzymie opory, szczególnie jeżeli chodzi o rośliny sadownicze, nawet wtedy, gdy korzyści z tej metody są ewidentne. Chodzi tu głównie o produkcję materiału szkółkarskiego-matecznikowego. Rośliny otrzymane metodą mikrorozmnażania wykazują cechy juwenilne, a więc mają bardzo wysoką zdolność ukorzenia się i wzrostu wegetatywnego. Mateczniki, np. truskawek, zakładane z sadzonek *in vitro* są znacznie bardziej produktywnie niż z tradycyjnie otrzymywanych roślin [2, 3, 6, 22].

Mimo licznych oporów metodę mikrorozmnażania rozpoczęto stosować również do otrzymania zdrowego szkółkarskiego materiału sadowniczego. Metoda ta pozwala bowiem na otrzymanie roślin wolnych od chorób wirusowych i innych patogenów, np. patogenów glebowych [6].

Kultury pędowe są coraz częściej jedyną dopuszczalną „formą” przewożenia czy wymiany materiału roślinnego. Sterylne kultry *in vitro* stanowią bowiem zabezpieczenie przed rozprzestrzenieniem chorób czy szkodników przenoszonych wraz z materiałem roślinnym.

PODSUMOWANIE

Mikrorozmnażanie nie może być oczywiście uważane za metodę uniwersalną, która powinna zastąpić tradycyjne metody rozmnażania. Nie

ma jednak podstaw, aby uważać ją za nieprzydatną. Tak jak każda metoda prowadzona nie umiejętnie, z całą pewnością nie da dobrych wyników. Nie będzie to jednak wina metody. Obecnie prowadzone są w Instytucie Sadownictwa i Kwaciarstwa badania nad występowaniem zmienności u truskawek i wiśni otrzymywanych metodą *in vitro*. Celem tych prac jest otrzymanie danych, które pozwoliłyby określić warunki stosowania mikrorozmnażania w praktyce sadowniczej. Prace dotyczą „etapu w szkle”, ale również uprawy roślin po wyjęciu ze szkła. Niepłodzenia (głównie niewyrównany wzrost) spotykane w uprawie roślin sadowniczych, pochodzących z mikrorozmnażania są często spowodowane uprawianiem ich jak rośliny rozmnażane tradycyjnie. Tymczasem niezbędna jest optymalizacja trzech czynników: dostępności składników pokarmowych, wody i odpowiedniego podłoża.

LITERATURA

- [1] BORKOWSKA B. 1990. Rate of proliferation and efficiency of rhizogenesis of sour cherry cultures recultured *in vitro* for several years. *Fruit Sci. Rep.* 17: 165-170.
- [2] BOXUS P. 1992. Mass propagation of strawberry and new alternatives for some horticultural crops. W: KURATA K. i KOZAI T. (red.), *Transplant Production Systems*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. ss. 151-162.
- [3] BOXUS P., DAMIANO C., BRASSEUR E. 1983. Strawberry. W: D. A. EVANS, W. R. SHARP, P. V. AMMIRATO, Y. YAMADA (red.), *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan, New York. ss. 453-486.
- [4] van den BULK R. W., LOFFLER H. J. M., LINDHOUT W. H., KOORNNAEG M. 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theor. Appl. Genet.* 80: 817-829.
- [5] De KLERK D. J. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39: 129-144.
- [6] DREW R. A., HERRINGTON M. E., GREBER R. S., DUNCALFE F. 1986. Tissue culture and subsequent field evaluation of strawberry. *Queensland J. Agric. and Animal Sci.* 43: 91-96.
- [7] EVANS D. A., SHARP W. R. 1986. Application of somaclonal variation. *Biotechnology* 4: 528-532.
- [8] FAEDI W., ROSATI P. 1983. Reversion of spur clones of „Delicious” and „Golden Delicious” apple trees. *Acta Hort.* 159: 57-61.
- [9] FAURE O., MENGOLI M., NOUGAREDE A., BAGNI N. 1991. Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic

- and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J. Plant Physiol.* **138**: 545–549.
- [10] HAMMERSCHLAG F. 1990. Somaclonal variation in peach. W: BAJAJ Y. P.S. (red.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. II. Somaclonal variations in Crop Improvement I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ss. 529–537.
- [11] LARKIN P. J., SCOWCROFT W. R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 197–214.
- [12] LEE M., PHILLIPS R. L. 1988. The chromosomal basis for somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **39**: 413–437.
- [13] LESHEM B. 1986. Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. *Hort. Sci.* **21**: 320–321.
- [14] MORRISON R. A., WHITAKER R. J., EVANS D. A. 1988. Somaclonal variation: its genetic basis and prospects for crop improvement. W: CONN E. C. (red.), *Opportunities for Phytochemistry and Plant Biotechnology*. Plenum Publishing Corporation, ss. 1–18.
- [15] MURASHIGE T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 135–168.
- [16] NEHRA N. S., STUSHNOFF C., KARTHA K. K. 1990. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Sci.* **66**: 119–126.
- [17] NEHRA N. S., KARTHA K. K., STUSHNOFF C., GILES K. L. 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **29**: 257–268.
- [18] PREIL W. 1986. *In vitro* propagation and breeding of ornamental plants: advantage and disadvantage of variability. W: SEMAL J. (red.), *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, ss. 377–403.
- [19] REISCH B. 1989. Genetic variability in regenerated plants. W: D. A. EVANS, W. R. SHARP, P. V. AMMIRATO, Y. YAMADA (red.), *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan, New York, ss. 748–769.
- [20] SKIRVIN R. M. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* **27**: 241–266.
- [21] SWARTZ H. J. 1991. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. W: P. C. DEBERGH i R. H. ZIMMERMAN (red.), *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, ss. 95–121.
- [22] ZIMMERMAN R. H. 1991. Micropropagation temperate zone fruit and crops. W: P. C. DEBERGH i R. H. ZIMMERMAN (red.), *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, ss. 231–246.