



Indukcja zmienności genetycznej *in vitro*

Barbara Skucińska

Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza, Kraków

Induction of genetic variation *in vitro*

Summary

The effectiveness of traditional methods for inducing genetic variation has greatly increased with the introduction of various techniques *in vitro*. The new methods of obtaining generative and somatic hybrids *in vitro* have resulted in a greater recombinant variation, exceeding the levels delimited hitherto by mating barriers. The potential for producing mutants has expanded due to the use of mutant somatic cells (brought in with the explant) as well as to the application of mutagens to individual cells and protoplasts, the haploid ones in particular. Two specific types of variation, i.e. somaclonal and gametoclonal variation, have proved to arise under the influence of various factors in tissue culture. However, the full application of these two types is inhibited to some extent by the constraints on the regeneration ability of plants in culture, on the possibility to select variants *in vitro*, and on the continuity of the resulting changes. Cultures *in vitro* also make it possible to introduce directional genetic changes through the application of molecular techniques.

Key words:

genetic variation, mutagenesis *in vitro*, somaclonal variation.

Adres do korespondencji

Barbara Skucińska,
Katedra Hodowli Roślin
i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza,
ul. Łobzowska 24,
31-140 Kraków.

1. Wstęp

Różnorodność genetyczna ma podstawowe znaczenie w procesie hodowli roślin, czyli w udoskonalaniu roślin uprawnych. Paradoksem jest, że hodowca, zmierzając w końcowym etapie wytwarzania nowej odmiany rolniczej do jak najlepszego wyrównania materiału hodowlanego, zawsze rozpoczyna hodowlę od poszukiwania lub indukowania zmienności genetycznej.

2. Zmienność rekombinacyjna i mutacyjna – ograniczenia metod klasycznych

Klasyczne metody uzyskiwania różnorodności w materiale wyjściowym do hodowli polegają głównie na krzyżowaniu roślin i indukowaniu mutacji. Zmienność rekombinacyjna, umożliwiająca połączenie korzystnych cech różnych osobników w ich potomstwie, ma jednak wyraźne ograniczenia wynikające z barier systematycznych. Dystans genetyczny pomiędzy gatunkami roślin najczęściej nie pozwala na skuteczne zapłodnienie lub normalny rozwój zarodka mieszańcowego. Trudności w uzyskaniu odległych systematycznie mieszańców dobrze ilustruje historia pszenżyta: od prób uzyskania płodnego mieszańca pszenicy i żyta podejmowanych przez Müntzinga upłynęło prawie 40 lat, zanim wyhodowano pierwsze odmiany nowego zboża. Pewien postęp w hodowli krzyżówkowej przyniosło zastosowanie metod cytogenetycznych, umożliwiających przenoszenie pomiędzy gatunkami pojedynczych chromosomów zawierających pożądane geny, bez balastu pozostałych chromosomów, i tworzenie tym sposobem linii substytucyjnych i addytywnych wykorzystywanych w hodowli. Jest również możliwe uzyskiwanie – dzięki translokacji – mieszańców strukturalnych, wzbogaconych tylko o fragment obcego chromosomu, na którym znajduje się pozytywny gen. Ta grupa metod, chociaż trudna technicznie i pracochłonna, jest szczególnie użyteczna przy przenoszeniu genów odporności z gatunków dzikich do uprawnych. Zastosowanie mutagenyzy do zwiększenia zmienności genetycznej rozwijało się dynamicznie począwszy od lat siedemdziesiątych. Efektem było wyhodowanie z udziałem mutantów ok. 2 tys. nowych odmian uprawnych: są to głównie odmiany zbóż i roślin pastewnych, u których uzyskano karłowaty pokrój, polepszono plenność lub odporność na choroby. Mniejszy udział miały rośliny rozmnażane wegetatywnie, najwięcej nowych form uzyskano u roślin ozdobnych. Metoda ta wymaga jednak selekcjonowania przez 3-4 pokolenia bardzo dużego materiału roślinnego i wyeliminowania chimer, a przy tym daje niewielką szansę uzyskania planowanej zmiany ze względu na nieukierunkowane działanie mutagenów. Zasadniczy postęp w indukcji zmienności genetycznej, przewyższający w znacznej mierze ograniczenia metod klasycznych, wprowadzono dzięki zastosowaniu metod biotechnologicznych, opartych głównie na wykorzystaniu roślinnych kultur *in vitro*. W praktycznej hodowli roślin stosuje się je począwszy od lat siedemdziesiątych.

3. Rozszerzenie granic krzyżowalności w kulturach *in vitro*

Ograniczenie krzyżowalności wynikające z odległości systematycznej zostało pokonane w licznych przypadkach przez zapłodnienie *in vitro*, które pozwala na przewyciężenie barier prezygotycznych, lub przez hodowlę na pożywce izolowanych zarodków mieszańcowych, wówczas gdy występują bariery postzygotyczne. Otrzymywanie mieszańców somatycznych w kulturach protoplastów doprowadziło do

syntezy gatunków nie tylko przez połączenie jąder komórkowych, ale również przez zlanie się cytoplazmy partnerów, wnoszącej dodatkowo cechy uwarunkowane genomem mitochondriów i chloroplastów. Podobnie jak kultury *in vitro*, które zwiększyły możliwości pozyskania nowych kombinacji cech, również indukowanie *in vitro* zmienności genetycznej poszerzyło pole działania hodowcy poszukującego nowych właściwości roślin. W tym zakresie można uzyskać *in vitro* dwojaką zmienność: mutacyjną i somaklonalną.

4. Indukcja zmienności mutacyjnej *in vitro*

Obiektem dla indukcji mutacji mogą być zarówno kultury *in vitro* jak też fragmenty roślin poddane mutagenезie przed wyłożeniem eksplantatów na pożywkę. Stosuje się takie same mutageny jak *in vivo*. Spośród mutagenów fizycznych najczęściej używa się promieniowania jonizującego; zalecane są również promienie UV, rzadko stosowane *in vivo* z powodu niewielkiej przenikliwości. W kulturach można poddawać promieniowaniu UV pojedyncze komórki, zawiesiny komórkowe lub pojedyncze warstwy komórek. Najczęściej stosowane w kulturach mutageny chemiczne to związki alkilujące. Dozowanie różnych rodzajów mutagenów powinno być łatwe do mierzenia i do powtórzenia przy założeniu, że standaryzacja innych czynników kultury jest dokładnie przestrzegana. Bardzo ważne jest stosowanie takich dawek mutagenów, które pozwolą na przeżycie zmutowanych komórek i regenerację mutantów. Z tego względu należy wstępnie zbadać reakcję kultury na wzrastające dawki mutagenu. Przy ustalaniu dawki trzeba również wziąć pod uwagę większą możliwość – w porównaniu z warunkami *in vivo* – przenikania mutagenów do stosunkowo niewielkiej masy komórek, najczęściej niczym nie chronionych. W tkankach wielokomórkowych penetrację mutagenów chemicznych ułatwia dwumetylo-sulfotlenek (DMSO). Działanie chemicznego czynnika mutagennego trwa określony czas, po upływie którego należy kulturę przenieść na świeżą pożywkę; również radiacja może spowodować zmiany chemiczne w pożywce. Wiadomo, że w każdej komórce zachodzą inne mutacje, dlatego w kulturach *in vitro* można uniknąć powstawania chimer przez działanie mutagenem na kultury komórek w zawiesinie lub na tkanki, w których organy przybyszowe (pędy, zarodki) powstają z jednej komórki merystematycznej. Nie wszystkie komórki zmutowane są jednak zdolne do zregenerowania roślin, co stanowi dość znaczne ograniczenie w posługiwaniu się mutagenami w zawiesinach komórkowych. Możliwe jest natomiast rozdzielenie *in vitro* tkanek chimerycznych po lokalizacji sektora zmutowanego. Szczegółowy opis postępowania przy indukowaniu mutacji *in vitro* podają liczni autorzy (1,2).

Bardzo korzystne jest, jeśli selekcję zmutowanych komórek można przeprowadzić *in vitro*, ponieważ w ten sposób oszczędza się areal i czas oraz zmniejsza się koszty związane z selekcją kompletnych roślin. Do selekcji *in vitro* szczególnie nadają się cechy odporności na niektóre stresowe czynniki biotyczne i abiotyczne;

w niewielkim, niestety, zakresie da się w ten sposób selekcjonować ważniejsze cechy agronomiczne, takie jak plenność czy wczesność.

Bardzo dużym ułatwieniem jest możliwość indukowania mutacji w komórkach haploidalnych, takich jak mikrospory poddane procesowi androgenezy *in vitro* lub haploidalne protoplasty (3). Zapewnia to otrzymanie jednolitych mutantów, bez sektorów chimericznych, oraz ułatwia wykrycie mutantów już u roślin M1.

Szczególnie korzystna okazała się indukcja mutacji *in vitro* u gatunków rozmnażanych wegetatywnie, szczególnie u tych, które tworzą Nieliczne sadzonki lub sadzonki o dużych rozmiarach. Równoczesne poddanie mutagenzie licznego materiału roślinnego, a następnie szybkie namnożenie mutantów *in vitro* umożliwi ocenę ich przydatności w różnych środowiskach i znaczne skrócenie czasu potrzebnego do wyhodowania nowych odmian. Pozytywne wyniki mutacji *in vitro* osiągnięto u ziemniaka, manioku, bananów i platanów (4). Indukcji mutacji w kulturach roślinnych może towarzyszyć zmienność somaklonalna, ich sumujące się efekty są trudne do odróżnienia.

5. Zmienność somaklonalna

Innym rodzajem zmienności, która powstaje w kulturach spontanicznie i może być kontrolowana tylko w ograniczony sposób, jest zmienność somaklonalna (2,5). Zróżnicowanie roślin uzyskanych *in vitro* z eksplantatów tkanek somatycznych jednej rośliny matecznej nazywa się zmiennością somaklonalną, a zmienność powstającą w kulturach gametofitu – zmiennością gametoklonalną.

Zmienność somaklonalna może być wynikiem genetycznego zróżnicowania tkanek, z których składał się eksplantat pierwotny. Eksplantaty mogą zawierać tkanki o różnej poliploidalności i zmutowane komórki somatyczne, które poza kulturą nie miałyby możliwości przekazania zmienionych cech drogą generatywną. Oprócz zmienności wniesionej z eksplantatem, na powstanie zmienności somaklonalnej wpływa istotnie sposób regeneracji roślin oraz niektóre czynniki kultury.

Mechanizm zmienności somaklonalnej nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Zmienność ta nie jest jednak klasyfikowana jako odrębny rodzaj zmienności, lecz jako suma różnych zjawisk genetycznych, takich jak mutacje genomu jądrowego i plazmatycznego powstające pod wpływem warunków kultury, oraz zmiany będące skutkiem stresu, takie jak zwiększenie amplifikacji genów, uaktywnienie transpozonów, zmiany metylacji DNA i stresowe zmiany metaboliczne w merystemach szlaku plciowego.

Charakterystyka zmienności somaklonalnej wskazuje na jej odmienność w stosunku do zmienności mutacyjnej. Występuje z większą częstotliwością, nawet do kilkunastu procent wariantów w jednym cyklu mnożenia, przy czym w kolejnych cyklach częstotliwość zmian może się nie powtarzać. Spektrum zmian może być takie samo lub odmienne od mutacji indukowanych, taka sama zmiana może obejmować

dużą część populacji, może dotyczyć zarówno cech ilościowych jak cech jakościowych. Zdarza się, że w przeciwieństwie do mutacji indukowanych czynnikami mutagenicznymi zmiany dość często są dominujące, a nawet mogą być homozygotyczne.

Podatność na zmienność somaklonalną związana jest w dużej mierze z gatunkiem rośliny. Są gatunki stabilne, nie ulegające zmianom, takie jak słonecznik, lilia i hiacynt, oraz gatunki podatne, takie jak tytoń, ziemniak i trzcina cukrowa. Mogą wystąpić znaczne różnice odmianowe i indywidualne we wrażliwości na warunki *in vitro*. Formy poliploidalne łatwiej ulegają zmianom niż diploidalne. Istotne jest również pochodzenie eksplantatu. Fragmenty starszych organów, bardziej zróżnicowanych tkanek i odcinki łodyg (w porównaniu z korzeniami) mają większą skłonność do zmian. Istotne znaczenie ma rodzaj kultury. Najłatwiej ulegają zmianom kultury kalusowe oraz pochodzące z kalusów kultury zawiesin komórkowych i kultury protoplastów. Wiadomo, że pod względem genetycznym kalus jest tkanką niestabilną – występują w nim zmiany zarówno liczby jak i struktury chromosomów. Analizy cytologiczne kalusów oraz roślin zregenerowanych z kalusa wskazują na znacznie większą niż w naturze częstotliwość występowania komórek poliploidalnych i aneuploidalnych oraz pęknięć chromosomów, związanych głównie z regionami heterochromatycznymi, a w rezultacie na powstawanie różnych rodzajów aberracji chromosomowych. W długotrwałej hodowli kalusów niektórych gatunków obserwowano również eliminację chromatyny z jądra komórkowego i tworzenie się mikrojąder, somatyczny *crossing-over*, fuzję chromatyd i chromosomów, powstawanie chromosomów policentrycznych i olbrzymich. Pędy przybyszowe zregenerowane w centrach merystematycznych kalusa najczęściej przenoszą zmienność somaklonalną, w przeciwieństwie do pędów powstających z merystemów wierzchołkowych i bocznych. Nie muszą jednak odzwierciedlać wszystkich zaburzeń chromosomalnych, ponieważ komórki genetycznie zbalansowane mnożą się szybciej od komórek wadliwych i w ten sposób dochodzi do naturalnej selekcji komórek w budującym się organie, a sito mejozy ogranicza płodność wariantów z defektami chromosomów.

Do zwiększenia zmienności somaklonalnej przyczynia się znacząco sposób prowadzenia kultury. Kultury długotrwałe, przedłużone pасаże, płynne pożywki, wysokie stężenie regulatorów roślinnych, szczególnie 2,4-D, zwiększają prawdopodobieństwo zmienności.

Zmienność obserwowana w kulturach może nie być trwała. Może trwać do czasu, w którym tkanki i organy roślinne znajdują się *in vitro*, np. w przypadku gdy skutek wysokiej wilgotności i zastosowania regulatorów roślinnych formuje się niedostateczna warstwa wosku i następuje zmiana w budowie tkanki mięksiszowej liści oraz dochodzi do nadmiernego uwodnienia tkanek (witryfikacji). Zmiany te ustępują *ex vitro*. Rośliny zregenerowane w kulturach mogą wykazywać zmiany, które nie przenoszą się drogą generatywną (warianty), zmiany zanikające po kilku pokoleniach wegetatywnych lub generatywnych oraz trwałe zmiany dziedziczne. Pojęcie zmienności epigenetycznej określające dotąd zmianę ekspresji genu, nie przekazywaną drogą generatywną, obecnie jest również używane do określenia zanika-

jących zmian w kilku pokoleniach regenerantów. Zmienność somaklonalna charakteryzuje się dużą niestabilnością, a najbardziej nietrwałe są zmiany będące skutkiem stresu. Podobnie jak w przypadku mutacji, kierunek zmian nie jest możliwy do przewidzenia, a większość zmian jest nieprzydatna.

Selekcja pozytywnych somaklonów jest wykorzystywana przez hodowców jako tanie i łatwo dostępne, chociaż mało precyzyjne, narzędzie ulepszania roślin, w tym starych, wartościowych odmian, bez potrzeby długotrwałej hodowli. W ten sposób u starej amerykańskiej odmiany ziemniaka Russet Burbank uzyskano 60 klonów bardziej wartościowych pod względem plenności i odporności, selekcionując je z 10 tys. somaklonów. Podobne wyniki uzyskano u trzciny cukrowej, tytoniu, ryżu, kawy i innych gatunków. Najwięcej zmian dotyczących morfologii roślin opisano u roślin ozdobnych i rozmnażanych wegetatywnie (6). Zmienność somaklonalna może być skutecznie wykorzystana u gatunków charakteryzujących się niewielką zmiennością, w przypadkach cech trudno osiągalnych i trudnych do wprowadzenia przez krzyżowanie, np. u gatunków apomiktycznych. Zmienność somaklonalna jest niepożądana w kolekcjach *in vitro*, u roślin transgenicznym oraz przy mikrorozmnażaniu roślin o dłuższym cyklu życiowym, np. u roślin drzewiastych. Wyjaśnienie mechanizmu zmian, ograniczenie ich niestabilności oraz udoskonalenie metod selekcji *in vitro* może przyczynić się do większego wykorzystania zmienności somaklonalnej w hodowli roślin.

6. Perspektywy

Wymieniając różne sposoby powiększania zmienności genetycznej za pomocą technik *in vitro* należy podkreślić szczególne znaczenie kultur roślinnych dla rozwoju transgeniki. Ten fascynujący kierunek badań, który teoretycznie umożliwia dowolne przenoszenie genów między organizmami, szybko znajduje zastosowanie w postaci odmian roślin transgenicznym (GMO) uprawianych na świecie już na milionach hektarów. W tej sytuacji poszukiwanie zmienności genetycznej innymi sposobami jest, jak się wydaje, mniej przydatne. Dopóki jednak przy transformowaniu roślin nie uporamy się z ograniczeniami, a mechanizm działania i współdziałania genów nie zostanie wyjaśniony, w hodowli roślin muszą nadal rozwijać się i funkcjonować inne metody indukowania zmienności genetycznej.

Literatura

1. Novak F. J., (1991), in: *Plant Mutation Breeding for Crop Improvement*, IAEA, Vienna, 327–342.
2. Harten A. M. van, (1998), *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*, Cambridge Univ. Press, 163–203.
3. Małuszyński M., Szarejko I., Sigurbjörnsson B., (1996), in: Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., *In vitro Haploid Production in Higher Plants 1*, Kluwer Acad. Publish., Dordrecht, 67–93.

4. Maluszyński M., Ahloowalia B. S., Sigurbjörnsson B., (1995), *Euphitica*, 85, 303–315.
5. Brar D. S., Jain S. M., (1998), in: Eds. Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, Kluwer Acad. Publish., Dordrecht, 15–37.
6. Jain S. M., de Klerk G. J., (1998), *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4(2), 63–75.