

## 1. Wstęp

Istnienie zmienności genetycznej i niegenetycznej występujących przeważnie z bardzo dużą częstotliwością zostało stwierdzone już na przełomie lat sześćdziesiątych (36,37). Zmienność pojawiająca się w wyniku stosowania przede wszystkim takich technik kultur *in vitro*, które zawierają fazę kalusa uznano za oddzielny rodzaj. W celu odróżnienia jej od dotychczas poznanych nazwano ją „zmiennością somaklonalną” (56), w przypadku gdy materiałem wyjściowym do kultury były komórki somatyczne oraz „zmiennością gametoklonalną”, gdy materiałem wyjściowym były gamety. Zmienione klony powstałe w wyniku kultury komórek somatycznych określono jako „somaklony”, a w wyniku kultury protoplastów „protoklony”.

## 2. Mechanizmy zmienności somaklonalnej

Fakty dotyczące zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* przedstawiono w licznych publikacjach (13,48,56,81). Sugerują one, że u jej podłoża leżą zarówno trwale zmiany w materiale genetycznym jądra i organelli, jak również zmiany epigenetyczne. Zmiany te mogą utrzymywać się dłużej lub krócej, prawdopodobnie w zależności od mechanizmów, które je wywołują. Zmienność indukowana w kulturze *in vitro* ma właściwości, które w sposób zdecydowany odróżniają ją od zmienności indukowanej metodami mutagenyzy klasycznej. Należą do nich: 1) nieprzewidywalność co do częstotliwości i spektrum zmian w kolejnych powtórzeniach (w czasie i przestrzeni); 2) częste występowanie „masywnej” zmienności cech ilościowych już u zregenerowanych roślin, polegającej nie tylko na zwiększeniu wariacji, ale często również zmianie średnich (26,48,83). Są one często przekazywane na następne pokolenia; 3) pojawianie się homozygotycznych mutacji już w zregenerowanych roślinach (25,31); 4) pojawianie się zmienności zachowującej się jak dominująca i zanikająca po dłuższym lub krótszym czasie; 5) pojawianie się zmian tkankowo specyficznych (sprzeczność z punktem 1 jest pozorna); 6) duża liczba zmian epigenetycznych.

Tak duże różnice efektów między tymi dwoma metodami indukowania zmienności wynikają z różnic w ogólnych mechanizmach indukcji. Mutageny, najogólniej mówiąc, działają poprzez bezpośrednią reakcję z różnymi komponentami komórki, w szczególności DNA, co prowadzi do zmian pewnej części tych składników. Zmiany te mogą być naprawione lub nie, i wtedy są przetworzone na mutacje. W ich wyniku komórka nie zmienia swego charakteru, czyli np. komórka apikalna stożka wzrostu jest nią nadal, chociaż może się wolniej dzielić lub przy cięższych uszkodzeniach w ogóle zaniechać podziałów. Losowość zmian może prowadzić nawet do ciężkich uszkodzeń komórki, jednak na ogół nie zmienia to jej szlaków rozwojowych. Inaczej jest w przypadku kultury *in vitro*. Czynniki kultury, same najczęściej nie będąc mutagenami, sterują rozwojem komórek i powodują zmiany lub włączenie nowych, niezgranych z dotychczasowymi, ciągów metabolicznych i rozwojowych komórki. Powstała dysharmonia prowadzi

do pojawiania się dużej liczby zmian, które mogą być utrzymywane krócej lub dłużej w zależności od ich charakteru (genetyczny lub epigenetyczny).

Zmiany te są bardzo różnorodne co wynika z olbrzymiej liczby czynników odciskających swe piętno na tak labilnym układzie jakim jest kultura *in vitro*. Mogą mieć one charakter trwałych zmian w materiale genetycznym lub tylko dotyczyć ekspresji genów. Duża labilność w kulturze *in vitro* może wynikać ze zmniejszenia homeostazy eksplantatu. Organizm jako całość gwarantuje znacznie lepszą stabilność poszczególnym swoim częściom niż warunki kultury (im mniejsza część organizmu jest użyta jako eksplantat tym większa jest jego wrażliwość na czynniki zewnętrzne – mniejsza homeostaza). Dlatego też sugerowane mechanizmy zmienności somaklonalnej są dotychczas wysoce hipotetyczne. Wielorakość skutków wywołanych przez składnik kultury wskazuje na istnienie dużej liczby mechanizmów molekularnych prowadzących do zmienności genetycznej i zmian w ekspresji genów.

## 2.1. Opóźniona replikacja heterochromatyny (ORH)

ORH wg Lee i Phillipsa (60) jest jedną z najważniejszych przyczyn aberracji chromosomowych. W cytogenetyce znany jest od dość dawna fakt, że w fazie S cyklu komórkowego regiony heterochromatynowe chromosomów (szczególnie heterochromatyna konstytutywna) są później replikowane niż euchromatynowe (64). Zjawisko to ma związek z większą częstotliwością aberracji w chromosomach zawierających heterochromatynę konstytutywną w szczególności zaś wewnątrz tych regionów lub w ich pobliżu. Zakłócenia w przebiegu cyklu komórkowego, a w szczególności fazy S mogą potęgować ryzyko tych zmian. Warunki kultury *in vitro*, a w szczególności skład pożywki i fluktuacja jej składu między pasażami – muszą prowadzić do zmian metabolicznych komórek, w tym również licznych przypadków rozsynchronizowania przebiegu fazy S cyklu mitotycznego dzielących się komórek. W przypadku dużych zakłóceń w fazie S mogą być szczególnie narażone na niedokończenie syntezy DNA regiony heterochromatyny. Wyniki licznych prac popierają te sugestie. Już w 1971 r. Sacristan (88) stwierdziła, że w 82% przypadków zmian chromosomów punkty pęknięcia były ulokowane w regionach z późną syntezą DNA. Również u owsa stwierdzono, że duża liczba telocentrycznych chromosomów powstających w kulturach *in vitro* była spowodowana opóźnieniem replikacji pericentrycznych regionów heterochromatyny (46,47,74). Lee i Phillips (60) przyjęli dla kultur jako jeden z możliwych model zdarzeń zaproponowany wcześniej przez Rhoadesa i Dempsey (86). W wyniku „niedokończenia” replikacji DNA w regionie heterochromatynowym tworzy się w anafazie most chromatynowy. Pęknięcia w homologicznych chromosomach mogłyby prowadzić do duplikacji i deficyjencji, natomiast w niehomologicznych do wzajemnej wymiany. Tak zatem w modelu tym zakłada się rozkład preferencyjnych miejsc aberracji chromosomowych w kariotypie zależny od rozkładu bloków heterochromatyny. Model ten tłumaczyłby obserwowany rozkład zmian chromosomalnych w kulturach tkankowych w wielu pracach (2,3,9,10,55,77,91).

## 2.2. Niezbalansowanie puli nukleotydowej (NPN)

Zjawisko to może być jedną z poważniejszych przyczyn zakłóceń metabolizmu kwasów nukleinowych, a w konsekwencji prowadzić do prawie wszystkich możliwych typów zmian genetycznych (60). Dezoksyrybozotrójfosforany (dNTP) biorą udział w licznych procesach podstawowych dla życia komórki – replikacja, transkrypcja, reperacja, rekombinacja i inne. Tewari i inni (98) u *Nesokia indica*, a Jackey i inni (43) w limfocytach człowieka stwierdzili, że niedobór w pożywce kwasu foliowego i tymidyny prowadziły do pojawiania się „łamiwych miejsc” na chromosomach, tj. miejsc nie barwiących się. Miejsca te były wyjątkowo podatne na pęknięcia. Jackey i inni (43) wykazali, że pojawianie się „łamiwych miejsc” jest spowodowane redukcją

AMP w późnej fazie syntezy DNA. Kunz i Haynes (53) stwierdzili również zwiększoną wrażliwość komórek na mutageny i większą częstotliwość transformacji nowotworowych, jako wyniki niezbalansowania puli dNTP.

Komórki roślinne są w znacznie większym stopniu samowystarczalne jeśli chodzi o dNTP, jednakże można się spodziewać, że warunki kultury, a w szczególności składniki pożywki mogą ingerować w biosyntezę nukleotydów, powodując między innymi jej większe niezbalansowanie. Bardzo istotnym czynnikiem, jak się wydaje, są zmiany składu pożywki między pasażami – wywołane z jednej strony wyczerpywaniem się składników pożywki, a z drugiej nagromadzeniem się metabolitów. Ważny może być również pasaż stanowiący rodzaj szoku.

### 2.3. Rekombinacja mitotyczna (RM)

Dla kultur tkankowych RM, jak się wydaje, jest unikatowym źródłem zmienności. Dotyczy to komórek somatycznych, z których najczęściej regeneruje się rośliny. Być może dlatego, mechanizm ten jest często uważany za unikatowe źródło zmienności dla kultur, mimo stosunkowo małej liczby dowodów na jego powszechność, nawet w kulturach. Rekombinacja mitotyczna obejmuje trzy typy zjawisk – mitotyczny *crossing over* (MCO), wymianę chromatyd sióstrzanych (SCE) i konwersję genów (GC). Jedno z najbardziej przekonujących doświadczeń, potwierdzających istnienie MCO, wykonali Lörz i Scowcroft (61). Używając protoplastów mezofilu *N. tabacum* heterozygotycznego w *loci aurea* (lub sulfur). W swoich badaniach nad udokumentowaniem występowania MCO w kulturach *in vitro* Loh i inni (66), regenerowali rośliny pomidorów z linii zawierającej aż 5 genów w stanie heterozygotycznym. Okazało się, że około 30% zregenerowanych roślin zawierało zrekombinowane układy genów. Autorzy sugerują również, że MCO jest odpowiednim narzędziem do łamania ścisłych sprzężeń w obszarach heterochromatyny lub jej pobliżu. Wyniki potwierdzające występowanie MCO uzyskała również Gaj (30) u *Arabidopsis thaliana*. Sugerowane przez niektórych autorów (56,57,60) SCE i GC, jako mechanizmy kreacji różnego typu i rozmiarów przebudowy chromosomów, tłumaczą częściowo uzyskane w niektórych przypadkach wyniki.

Konwersja genów i MCO należą do grupy mechanizmów niewzajemnego transferu genów prowadzącego do zwiększenia homozygotyczności. Wiadomo, że GC występuje wewnątrz chromosomów i między chromosomami homologicznymi (52) oraz między powtórzonymi genami niehomologicznych chromosomów podczas mitozy (80,105). W związku z tym autorzy sugerują, że prawdopodobieństwo zajścia GC jest proporcjonalne do liczby powtórzeń genu. W przypadku takich genów, jak np. gliadynowe, może wobec tego zachodzić dość często i prowadzić do homozygotyczności zmutowanych genów (57), jak również do translokacji. Coraz częściej wyrażany jest pogląd, że unifikacja sekwencji powtarzalnych jest podtrzymywana dzięki zjawisku GC (59,80). W związku z tym GC mogłoby być mechanizmem ograniczającym zmienność. W odcinkach o dużej homologii (powyżej 90%) szczególnie często dochodzi do niesymetrycznego MCO, jak również GC z przesunięciem. Konwersja z przesunięciem prowadzi do duplikacji i ujednoczenia genów nieallelicznych, co umożliwiałoby tzw. zgraną ewolucję (*concerted evolution*) genów nieallelicznych i sekwencji powtarzalnych DNA (84). Częstotliwość tych zjawisk wydaje się niemała i u drożdży częstość GC między nieallelicznymi genami his4 – wprowadzonymi sztucznie – była o rząd wielkości większa niż *crossing over* (42).

### 2.4. Transpozony

Wydaje się, że stanowią one udokumentowaną przyczynę zmienności somaklonalnej (choć w dalszym ciągu wzbudzają kontrowersje). Można je rozpoznać poprzez wyszukiwanie cech wysoce niestabilnych (częstotliwość rewersji jest prawie równa częstotliwości jej pojawiania się), i analizę molekularną takich loci. Peschke i inni (79), krzyżowali zregenerowane rośliny

zawierające ten element z roślinami otrzymanymi z nasion zawierającymi element Ds, chcąc wykazać aktywujący wpływ kultury *in vitro* na element Ac u kukurydzy. Rośliny zregenerowane były formami ojcowskimi. Z około 3% kalusów uzyskano rośliny z aktywnym elementem Ac. Aktywność tego elementu w kulturach *in vitro* obserwowali również Evola i inni (28). Stwierdzili oni także aktywność elementu Spm wśród połowy zregenerowanych roślin. Jednakże analiza restrykcyjna w loci Sh u sześciu mutantów nie wykazała różnicy w porównaniu z kontrolą. Autorzy uważają ponadto, że analiza restrykcyjna jest zbyt mało dokładną metodą do wykrycia tego typu zmian. Mutacja bowiem może być spowodowana krótką duplikacją (kilku nukleotydów) lub delecją podczas wycinania transpozonu. Istnieje również sugestia, że zjawiska niestabilności alleli, typowe dla aktywnych transpozonów, powodowały zmiany pigmentacji u petunii (34,35,58), kształtów i struktury powierzchni blaszki liściowej u ogórków (68) przez nie znane jeszcze dotąd transpozony.

Sposób w jaki transpozony mogą działać jako czynniki wywołujące zmiany genetyczne był już wielokrotnie omawiany (29,73). Skutkami procesu transpozycji mogą być różne typy i rozmiary zmian chromosomów, mutacje punktowe, zmiany w ekspresji genów przez regulacyjny wpływ transpozonów na sąsiadujące geny, zmianę schematu metylacji DNA. Trudniejszym problemem, jak się wydaje, jest kwestia określenia jakiego typu bodźce (pochodzące z kultury) powodują uruchomienie „milczących” dotychczas transpozonów. McClintock (72) oraz Lee i Phillips (60) uważają, że jednym z poważniejszych czynników uruchamiających transpozony mogą być pęknięcia i przebudowa chromosomów. Są to zdarzenia często występujące w komórkach *in vitro*. Jako jeden z możliwych scenariuszy proponują oni sekwencje zdarzeń: późna replikacja heterochromatyny → most, pęknięcie → przebudowa → aktywacja transpozonu → insercja i wycięcie → mutacja. Przy takim scenariuszu powinny być głównie uruchamiane elementy w obszarach heterochromatyny i jej pobliżu. Schemat ten sugeruje również korelację między zmiennością fenotypową a aberracjami chromosomowymi. Możliwość uchwycenia takiej korelacji uzależniona jest od udziału zmienności wywołanej transpozycjami indukowanymi wg tego schematu w ogólnej puli zmienności somaklonalnej.

Właściwym czynnikiem uruchamiającym transpozony, jak się wydaje, są zmiany w schemacie metylacji DNA. Znana jest rola metylacji DNA w ekspresji niektórych transpozonów bakteryjnych, np. w transpozonie Tn10 (51), polegająca na blokowaniu ekspresji transpozazy. Być może pęknięcia uruchamiające procesy reparacji i rekombinacji zmieniają, w obszarze w którym zachodzą, schemat metylacji i uruchamiają leżący w tym obszarze transpozon. Zmianę schematu metylacji w wyniku kultury wykazali Lörz i Brown (62). Znane są również inne czynniki uruchamiające transpozony i jednocześnie prowadzące do zmiany schematu metylacji (promieniowanie, chemiczne czynniki mutagenne). Za czynnik mutageny uważany jest 2,4-D (62). Tak zatem jeżeli zmiany metylacji w kulturach *in vitro* byłyby zjawiskiem powszechnym, to mogłyby być one ważnym czynnikiem transpozycji. McClintock (71), uważa, że do uruchomienia transpozonu jest potrzebny stres. Wydaje się, że umieszczenie komórki na pożywce, a następnie pasażę mogą być wystarczającymi czynnikami uruchamiającymi procesy – głównie demetylacji (11) – prowadzące do transpozycji.

## 2.5. Amplifikacja i deamplifikacja DNA

Amplifikacja genów jest procesem prowadzącym do zwielokrotnienia liczby kopii odcinka DNA w komórce. Kopie te mogą tworzyć tandemowo ułożone powtórzenia wewnątrz chromosomu lub minichromosomy bez centromerów. Amplifikacja prowadzi na ogół do czasowego zwiększenia liczby kopii tak, że nawet wielokrotnie powtórzone sekwencje wewnątrz chromosomów mogą ulegać deamplifikacji. Prawdopodobnie ta czasowość wynika z tego, że na ogół jest to reakcja na bodziec pochodzący ze środowiska, a zatem jest najprawdopodobniej sposobem regulacji funkcjonowania genów. Mechanizm ten jest włączany wtedy, gdy komórka

potrzebuje dużej ilości produktu genu, a zwiększenie jego produkcji przez przyśpieszenie transkrypcji jest niemożliwe. Brown (13), wyraził pogląd, że każdy gen, którego ekspresji nie można modulować, jest kandydatem do amplifikacji, w obecności odpowiedniego czynnika selekcyjnego. Dlatego możliwe jest, że niektóre parametry podczas hodowli kultury działają jak czynniki selekcyjne. Cytologicznym przejawem takiej amplifikacji jest najczęściej pojawienie się, w powiększonych chromosomach jednolicie barwiących się regionów (4). Często występuje też translokacja amplifikowanych genów do innych chromosomów. Pojawiają się także niestabilne linie komórkowe z minichromosomami (*doubleminutes*). Ponieważ obrazy te są tak różne, to zakłada się co najmniej kilka mechanizmów amplifikacji. Schimke i inni (89), którzy badali amplifikację genu reduktazy dihydrofolanowej (DHFR), nadającego komórkom oporność na metotreksatę, proponował kilka mechanizmów: 1) segmentalna nadreplikacja (*overreplikation*) z rekombinacją lub bez; 2) miejscowo-specyficzna integracja pozachromosomalnego DNA z zabitych komórek; 3) nierówna wymiana siostrzanych chromatyd. Szostak i Wu (97), wykryli udział nierównego MCO w amplifikacji genów rRNA u drożdży. SCE i MCO z jednej strony prowadzą do amplifikacji, a z drugiej – do deamplifikacji. Borisjuk i inni (7), jako możliwą przyczynę amplifikacji przyjmują podjednostki regionu intergenowego rRNA u mieszańców somatycznych *N. tabacum* i *Atropa belladonna*. Wymieniają również tzw. mechanizm zgranej ewolucji, którego główną składową jest konwersja genów.

Amplifikacja jako mechanizm reakcji na stres środowiskowy w bardzo przejrzysty sposób został wykazany w lnie przez Cullis (18) oraz Cullis i Chariton (19). Stosując różne warunki wzrostu roślin stwierdzili, że ilość ogólnego DNA może się zwiększać do 15%, w szczególności na skutek amplifikacji genów rRNA. Ta zwiększona ilość DNA była przekazywana na pokolenia F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub>. Analiza zmienności 5s rRNA w lnie w różnych genotrofach (środowiskowo indukowane trwałe zmiany) wykazała, że zmiany te są sterowane w tym sensie, że amplifikacji ulegają tylko określone fragmenty DNA, prawdopodobnie zależnie od czynnika i genotypu rośliny (90).

Lin i inni (65), znaleźli nowe miejsca restrykcyjne w regionie międzygenowym genów rRNA, powstałe i powielone na skutek amplifikacji u mieszańców kukurydzy i *Tripsacum*. Często również występowała deamplifikacja genów rRNA lub regionu międzygenowego (geny NOR). Brettell i inni (9, 10), odnotowali 80% redukcję długości regionu intergenowego rDNA u *Triticale* w chromosomie 1R. Zmiana ta okazała się dziedziczna. Breiman i inni (8), badali loci NOR w potomstwie roślin trzech odmian pszenicy (*Triticum aestivum*) zregenerowanych z kalusa *skute-lum*. Dwie odmiany nie wykazywały żadnych zmian. Natomiast, w trzeciej – u trzech roślin – nastąpiła redukcja odcinków międzygenowych. Landsman i Uhrig (54), badali zawartość rRNA i strukturę rDNA w *Solanum tuberosum*. W dwóch z dwunastu roślin stwierdzono 70% obniżenie liczby genów 25 S rRNA. Wystąpiła również amplifikacja DNA.

Często w kulturach uzyskiwano wzrost oporności na określony czynnik selekcyjny np. herbicyd. Może on wynikać ze wzrostu liczby kopii genu, którego produkt jest inaktywowany przez herbicyd. Najczęściej taka amplifikacja jest jednak niestabilna. Pierwsze doniesienie na ten temat przedstawił Donn i inni (24). Wyselekcjonowali oni linie komórek lucerny o odporności na działanie herbicydu fosfintyrcyny (TTC) 20–100 razy przewyższające formę kontrolną. Komórki odporne miały 3–7 razy podwyższony poziom enzymu syntetazy glutaminowej (GS). Formy te miały 4–11-krotną amplifikację genu GS i wytwarzały 8 razy więcej mRNA tego genu niż forma dzika. Jednocześnie komórki te straciły zdolność do regeneracji. U petunii uzyskano 20-krotną amplifikację genu syntazy 5-endopirogrono-szikimo-3-fosforanowej (EPSP), co spowodowało oporność na herbicyd glyfosat (Steinrucken i inni (95)). Xiao i inni (103), badali oporność komórek *Datura innoxia* w zawiesinach na herbicyd chlorosulfuron (CS). Atakowanym enzymem była syntaza acetonmleczanowa (ALS). Wyselekcjonowali oni linie komórek wysoce opornych na CS, u których była ona wywołana amplifikacją tandemowo ułożonych kopii genu ALS. Z linii tej uzyskano w wyniku dalszej kultury i selekcji, następną, dającą inny kalus, ale również oporną. Linia ta nie miała jednak segmentu, w którym były zwielokrotnione kopie genu ALS.

Autorzy zaproponowali następujące wyjaśnienie problemu. W amplifikowanym odcinku dość często zachodzą mutacje powodujące brak powinowactwa (oporność) enzymu do CS. Obecność herbicydu sterowała tak, że w wyniku nierównych SCE zachodzących w tym regionie wyeliminowane zostały (deamplifikacja) wszystkie kopie genu dzikiego jako zbędne, a pozostała tylko kopia genu kodującego ALS, niewrażliwe na CS.

Zupełnie nieznanne są przyczyny amplifikacji w kulturach *in vitro* – powtarzalnych często gatunkowo – specyficznych, niekodujących sekwencji DNA. Zheng i inni (104), stwierdzili nawet 75-krotne zwiększenie liczby kopii badanych przez nich 10 sekwencji DNA. DePeape inni (22), badali dziedziczenie jakościowych i ilościowych zmian DNA jądrowego homozygotycznych diploidalnych roślin *N. sylvestris*, otrzymanych z ciągłej kultury. Liczba kopii wzrastała z każdym cyklem. Z przeglądu tego wynika, że deamplifikacja jest mechanizmem głównie regulacji ekspresji genów, chociaż czasami jej efekty mogą być utrwalone. Częściej jednak bywają utrwalone efekty deamplifikacji. Amplifikacja nie ma nic wspólnego ze zmianą liczby chromosomów, jednak często może powodować zmiany ich struktury, ponieważ towarzyszą jej pęknięcia chromosomów. Jednakże nie jest pewne czy są one skutkiem czy też przyczyną amplifikacji. Windle i inni (102), zaobserwowali, że w indywidualnych komórkach CHO, w których zaszła amplifikacja, zachodziły również pęknięcia chromosomów w pobliżu genu amplifikowanego (DHFR) i delecja genu wraz z DNA flankującym. W związku z tym autorzy uważali, że centralną rolę w procesie amplifikacji odgrywało tu pęknięcie chromosomu, które powodowałoby: 1) tworzenie produktów pośrednich (amplikonów), które są początkowo acentryczne i prowadzą do zwiększenia liczby kopii poprzez nierówną segregację w kolejnych mitozach; 2) kreowanie atelocentrycznych końców, które były albo niecałkowicie replikowane, albo obcinane przez egz nukleazy, dając delecję; 3) tworzenie rekombinogennych końców, które byłyby preferowanymi miejscami w relokalizacji amplikonów (jednostka DNA ulegająca amplifikacji). Nie wiadomo jednak jak po stało pęknięcie. Gdyby to był jedyny mechanizm amplifikacji to wówczas w przypadku sterowanej amplifikacji, przypadkowe pęknięcie chromosomu musiałoby zostać zastąpione cięciem endonukleazy. Powstaje zatem pytanie jak regulowana byłaby wówczas długość amplikonu? Niektórzy badacze wyrażają pogląd, że amplifikacja w kulturach zachodzi tak łatwo dlatego, że mechanizmy kontrolujące zmienność DNA *in vivo*, na skutek ich rozchwiania przez kulturę, nie spełniają swej roli.

## 2.6. Mechanizmy epigenetyczne

Ekspresja genów, jak się wydaje, jest istotną przyczyną zmienności somaklonalnej, gdyż razem z amplifikacją genów jest odpowiedzialna za zmienność przejściową, która stanowi około 30% zmienności somaklonalnej.

Od dawna znana jest rola metylacji jako czynnika kontrolującego ekspresję genów. Lörz i Brown (62) dostarczyli dowodów, że kultura *in vitro* zmienia rozkład metylacji w DNA, który może utrzymywać się nawet w R2. W swoim doświadczeniu użyli oni kukurydzę, linii A 188. DNA roślin zmienionych (albinotyczność, karłowatość, pasiastość liści) jak i nie zmienionych oraz kontroli było trawione izoschizomerycznymi restryktazami HpaII i MspI. Obie te restryktazy rozpoznawały sekwencję CCGG. Pierwsza z nich była jednak niezdolna do cięcia CmCCGG, a druga mCCGG. Natomiast, żadna z nich nie cięła sekwencji mCmCCGG. Okazało się, że DNA z roślin zmienionych, jak i niezmienionych, wykazywało inną podatność na trawienie tymi enzymami niż rośliny kontrolne (nie przeszły przez kulturę).

## 2.7. Zmiany tkankowo-specyficzne

Mechanizm zmian tkankowo-specyficznych jest jak dotąd zupełnie nie znany. Spostrzeżenie, że takie zjawisko występuje, zrobił ostatnio Evans (27). Polega ono na tym, że pewne typy zmian z wysoką częstotliwością można uzyskać tylko wówczas, gdy donorem eksplantatu jest

tylko określona tkanka. Sree Ramulu (92) uzyskał z dużą częstotliwością pewne allele samoniezgodności (SI) u *Lycopersicon peruvianum* tylko wtedy, gdy regenerował rośliny z kultury pylników. Żadna inna droga nie doprowadziła do uzyskania tych alleli. Podobnie Staehr i inni (94), uzyskiwał z dużą częstotliwością, pewne typy zmian struktury kwiatu u *Populus* tylko u roślin powstałych drogą kultur pylnikowych. W obydwu przypadkach zmiany dotyczyły organów, z których pochodził eksplantat. Gdyby zbieżność była nieprzypadkowa a zjawisko powszechniejsze, wówczas byłaby możliwość – w pewnym stopniu – sterowania zmiennością.

W świetle przeprowadzonych prac nad amplifikacją DNA w *Inie* (102) czy w komórkach CHO (33), oraz nad metylacją (40, 90) zjawiska takie mogłyby być wywoływane sterowaną amplifikacją DNA, lub nawet sterowaną transpozycją jak to było w przypadku *Cyanobacterium* (32), czy *Podospora anserina* (50). Takie sterowanie amplifikacją mogłoby polegać na dopuszczalności amplifikacji w określonej tkance zdefiniowanych odcinków DNA. Mogłyby to też być epimutacje wywołane tkankowo specyficzną zmianą schematu metylacji. Mógłby też istnieć związek przyczynowo–skutkowy między taką tkankowo–specyficzną metylacją a amplifikacją odcinka ze zmienionym schematem metylacji, lub jego otoczenia.

Mutacje tego typu są tym bardziej interesujące, że wiadomo, iż brak jest jakichkolwiek regulacji do częstotliwości i spektrum zmienności po kulturze.

## 2.8. Metylacja

Rola modyfikacji DNA, w szczególności zaś zmiany metylacji (hypo/hyper metylacja), w indukowaniu zmian przez kulturę *in vitro* wydaje się tak wielka, że Phillips i inni (81), postawili tezę, że cała zmienność ma z nią bezpośredni lub pośredni związek. Czy rzeczywiście tak jest zweryfikują przyszłe badania. Jednak dotychczasowe prace, szczególnie z ostatnich kilku lat wskazują, na wzrastającą zależność między zmianami schematu metylacji, a innymi zmianami zachodzącymi w komórkach rosnących w warunkach *in vitro*. Tym samym wskazuje to na rosnącą rolę tego zjawiska w zmianach komórkowych. Wynika to z bardzo istotnych funkcji przypisywanych metylacji DNA, a w szczególności cytozyn w sekwencji CpG, a u roślin także CpNpG, w organizacji i ekspresji materiału genetycznego. Ocenia się, że około 8% cytozyn w zwierząt i 32% u roślin jest zmetylowanych (39).

Wykazano, że metylacja cytozyny w pozycji 5' w komórkach eukariotycznych w ww. sekwencjach ma związek z dwoma pierwszymi poziomami regulacji ekspresji genów, tj. 1) strukturą chromatyny i 2) poziomem inicjacji transkrypcji (40,41). Rozkład sekwencji 5'mCpG i 5'mCpNpG tworzy osobniczy schemat, który jest przekazywany przez gamety do kolejnych pokoleń. W kolejnych pokoleniach komórek, może być on przekazywany dzięki zdolności 5'-metylotransferazy do odtwarzania schematu metylacji DNA po replikacji na matrycy DNA hemimetylowanego. Jednakże, w trakcie rozwoju osobniczego, w wyniku procesów różnicowania, starzenia, onkogenezy, czy stresów środowiskowych, schematy metylacji ulegają mniej lub bardziej trwałym zmianom. Są reakcją na bodźce sterujące ekspresją genów. Jej regulacja odbywa się albo poprzez zmianę powinowactwa czynników transkrypcji, w szczególności w miejscach występowania tzw. „wysp CpG” w obrębie promotorów, względnie poprzez zmianę struktury chromatyny w obrębie genu (40,41). Do inicjacji transkrypcji najczęściej potrzebna jest demetylacja tych miejsc (dlatego geny określane jako *housekeeping* najczęściej są trwale zdemetylowane, przynajmniej w końcu 5'), chociaż stwierdzono, że w niektórych przypadkach transkrypcja genu może przebiegać przynajmniej okresowo, przy zmetylowanym promotorze (49). Często zmiany metylacji, jeżeli zdarzą się w komórkach linii generatywnej, to mogą być przekazywane na potomstwo (62,63), wywołując tzw. epimutacje. Niekiedy jednak, pewne geny (fragmenty DNA) są zmetylowane w gametach żeńskich, natomiast zdemetylowane w gametach męskich – jest to zjawisko tzw. imprintingu (96). Jeżeli takimi zdemetylowanymi odcinkami są transpozony, to poprzez uruchomienie ich może dojść do wystąpienia licznych mutacji,

które niekiedy mogą mieć charakter syndromu, jak to wykryto u *Drosophila melanogaster* i nazwano „hybrydową dysgenezą” (12). Zjawisko bardzo przypominające „hybrydową dysgenezę” zaobserwowano również prowadząc badania w ogórkach (69).

Oprócz normalnej regulacji, zmiany schematu metylacji są reakcją na stresowe czynniki środowiska, które działają jak ogólne regulatory typu hormonów, o których zdolności do zmian metylacji wspomniano wcześniej. Kultura *in vitro* spełnia warunki czynnika stresogennego, który dodatkowo zawiera zmienne ilości regulatorów wzrostu. W kilku ostatnich latach badane były zmiany schematów i ilości metylacji na różnych etapach kultury *in vitro* i u regenerantów, jak również pokoleniach dalszych, metodami HPLC, analizy najbliższego sąsiada i analizy restrykcyjnej DNA po cięciu restryktazami izoschizomerycznymi, wrażliwymi na metylację. Uzyskane wyniki nie dają jednak na razie jednolitego obrazu zmian metylacji i jej roli w poszczególnych etapach kultury *in vitro* i tworzeniu zmienności, chociaż mocno popierają sugestie Phillipsa i współpracowników (81). Większość prac wykazuje indukcję zmian metylacji w trakcie kultury i ich korelację ze zmiennością pojawiającą się w zregenerowanych roślinach.

Zmiany metylacji DNA indukowane podczas kultury *in vitro* można wg (2) podzielić na dwa typy: 1) odwracalne, 2) genetycznie stabilne. LoSchiavo i inni (67), wykazali, że w kulturze zawieszinowej marchwi embriogeneza mogła zachodzić tylko przy pewnym poziomie metylacji. Czasowe jej zwiększenie poprzez dodanie auksyny (zwiększenie 5'mC z 15 do 70%) przerywało embriogenezę. Również hypometylacja otrzymana poprzez dodanie czynnika blokującego metylację blokowała embriogenezę. Usunięcie czynników zmieniających metylację powodowało przywrócenie „podstawowego poziomu” (raczej podstawowego schematu) metylacji i indukowało embriogenezę. W późnym stadium embriogenezy jednak poziom metylacji wzrastał. Vergara i inni (99) wykazali, że podczas embriogenezy następowały zmiany metylacji obydwu cytozyn w sekwencji CpCpG, dwóch z 25 klonów wybranych z biblioteki DNA marchwi. Natomiast, Morrish i Vasil (75) nie znaleźli żadnych zmian ilościowych i jakościowych w kalusie embriogenicznym i nieembriogenicznym w porównaniu do eksplantatów liściowych pobranych z trzech miejsc 3, 5 i 7 liścia u *Pennisetum purpureum*. Prawdopodobnie zastosowano metodę o zbyt małej rozdzielczości (analiza DNA wybarwionego bromkiem etydydny na żelu agarozowym po cięciu restryktazami MspI, HpaII, EcoRII i BstNI).

Dość intensywnie badany jest stan zmetylowania podczas kultury, powtarzalnych sekwencji DNA, a szczególnie satelitarnego. Blundy i inni (6) wykazali, że rDNA komórek kalusa w inie miało trzy stany zmetylowania, w tym jeden zerowy. Wielkość klasy rDNA niezmetylowanego była niezależna od liczby kopii genów, która była zmienna w kulturze. W ten sposób utrzymywany był stały poziom rRNA, niezależnie od liczby kopii genów. Grisvard i inni (33), badając stan metylacji jednej, powtarzalnej sekwencji DNA satelitarnego i dwóch powtarzalnych sekwencji rozproszonych z liści kultury *Cucumis melo* stwierdzili, że stopień metylacji sekwencji satelitarnej nie zmieniał się, natomiast sekwencje rozproszone ulegały demetylacji, ale liczba ich kopii zmniejszała się bardzo mocno. Te dwie prace wskazują na związek przyczynowy między stopniem metylacji a redukcją liczby kopii genów. Anderson i inni (1), badali stan metylacji genów 18S–25S rRNA w różnych częściach roślin, kalusie z liści i zregenerowanych roślinach. Wśród organów roślinnych tylko korzenie różniły się stopniem metylacji (hypometylacja). Kultura bardzo zmieniała schematy metylacji, ale utrzymywały się one podczas późniejszych etapów kultury niezmienione. Autorzy wyrazili pogląd, że krytycznym momentem dla stanu metylacji rDNA komórek był pierwszy podział. Twierdzą, że wtedy ustalał się schemat metylacji, który potem już nie zmieniał się. Komórki w których występowała hypometylacja regenerowały, ale liście regenerantów miały znów normalny poziom metylacji tych genów.

Istnieje jednak wiele przykładów, że powstałe w kulturze schematy metylacji DNA przekazywane są następnym pokoleniom. Niektóre z nich omówione zostały wcześniej. Phillips i inni (81), używając jako sond losowo wybrany klon DNA i ADH1 do analizy RFLP DNA dwunastu somaklonów R2 linii A188 kukurydzy, ciętego restryktazami HpaII i MspI, stwierdzili, że w przy-



padku sondy losowej, tylko jeden somaklon był identyczny z formą wyjściową, natomiast w przypadku ADH1 – osiem. Wszystkie somaklony pochodziły z jednego eksplantatu (zarodek). Wszystkie te rośliny były jednak fenotypowo normalne. Nie wykazywały one również polimorfizmu po cięciu restryktazami niewrażliwymi na metylację. Deumling i Clermont (23) oprócz redukcji o ponad 25% satelitarnego DNA u triploidalnej formy *Scilla siberica*, stwierdzili również u regenerantów redukcję metylacji cytozyn, nie było jednakże znacznych zmian sekwencji zasad GC. Natomiast Rode i inni (87), stwierdzili brak zmian metylacji rDNA regenerantów pszenicy. Brown i inni (15), badali zmienność wśród roślin ryżu pochodzących z protoplastów. Analiza porównawcza RFLP DNA, ciętego restryktazami wrażliwymi i niewrażliwymi na metylację wykazała, że cały polimorfizm nie może być spowodowany tylko zmianami metylacji DNA.

Wydaje się, że regulacyjna rola metylacji DNA w kulturach *in vitro* bezpośrednio została wykazana w pracach nad transpozonomi i formami transgenicznymi. Brettell i Denis (11), dostarczyli dowodów, że kultura zmieniła status metylacji uruchamianego elementu Ac. Aktywność elementu mierzono ilością wyciętych elementów Ds. Zmieniony schemat metylacji elementu był dziedziczny (stabilnie przekazywany przez mejozę). Autorzy obserwowali w regenerowanych roślinach tylko tendencje do demetylacji, natomiast nie było tendencji do metylacji (inaktywacji) elementu Ac. Inaczej reagował transpozon Mn. Kultura nie uruchamiała elementów nieaktywnych (negatywna korelacja – 15), ale zwiększała aktywność już aktywnych (44,82).

Hapburn i inni (38), stwierdzili, że linia FT37/1 *Agrobacterium tumefaciens*, wprowadzała do lnu 22 – 24 kopii DNA, które były w skrajnie wysokim stopniu zmetylowane w zróżnicowany sposób. Metylacja była skorelowana ze skrajnie niską ekspresją syntazy nopolinowej. Traktowanie 5-azacytydyną w stężeniu  $3 \times 10^{-5}$  M powodowało demetylację średnio jednej kopii genu na komórkę. Demetylacji towarzyszył wzrost transkrypcji genu. Wysoki stopień metylacji komórek tumorów, jak się wydaje, jest zgodny z wcześniejszym stwierdzeniem, że hormony zmieniają poziom metylacji DNA, lub może być to blokowanie „niepotrzebnego” DNA, jak o tym wspomniano w przypadku rDNA.

Interesującym przykładem regulacji genów wydaje się wykluczanie ekspresji T-DNA obecnego w komórce po wprowadzeniu drogą powtórnej transformacji innego T-DNA. Obecność nowego T-DNA powodowała zmetylowanie starego i jego zablokowanie. Usunięcie później wprowadzonego T-DNA powodowało demetylację i ekspresję wcześniejszego (70).

W komórkach roślinnych rosnących *in vitro* w odróżnieniu od zwierzęcych metylowana może być nie tylko cytozyna. Dhar i inni (21), stwierdzili, że w ryżu, w wysokim stopniu tkanekowo specyficznie, metylowana również była adenina nukleotyd, który normalnie w tkance nie jest metylowany. Miiller i inni (76), wykazali w tym przypadku wyraźną korelację między ilością 6mA w zregenerowanych roślinach a ilością zmian DNA. Modyfikacja ta wydaje się нефизиологична, dlatego być może autorzy mogą uważać miejsca te jako tzw. *hot spots* mutacji, mimo że ta modyfikacja nie jest wymieniana jako produkt działania któregoś z ważniejszych mutagenów (45). Wynikałoby, że modyfikacja adeniny w pozycji 6' destabilizuje ją, a reperacja nie zawsze jest dokładna, względnie zmienia komplementację. Modyfikacja cytozyn w pozycji 5' okazuje się wysoce mutagenna, ponieważ zmetylowane cytozyny bardzo szybko drogą oksydatywnej deaminacji ulegają przemianom w tyminy, jednak w warunkach *in vivo* stała aktywność wysoce wyspecjalizowanych układów reperacyjnych selektywnie naprawiających niewłaściwe TG do CG utrzymuje DNA w nie zmienionym stanie (100,101). W warunkach *in vitro* nie można jednak wykluczyć tej drogi mutacji.

Z przedstawionego przeglądu wynika, że kultura prawie zawsze zmieniała metylację DNA komórkowego, przy czym najczęściej była to hypometylacja. Status metylacji mógł ulegać zmianie pod wpływem niektórych czynników środowiska, np. auksyny podwyższając poziom metylacji DNA natomiast cytokiny (2) i wiele innych, powodowało jego hypometylację. Efekt wielu czynników, które mają bardzo duży wpływ na kulturę, np. ciśnienie osmotyczne, zawartość i forma azotu itd., nie był badany. Często nowe schematy metylacji były stabilne.

Metylacja zdaje się spełniać rolę zarówno regulacji ekspresji genów (transpozony, T-DNA, blokowanie rDNA), jak i chroniącą całe odcinki DNA przed degradacją (rDNA, T-DNA). Ten typ zmian można uważać za epimutacje. W przypadku T-DNA i rDNA metylacja, jak się wydaje, występuje dopiero po amplifikacji. Nie wykluczone, że ilość zamplifikowanego DNA zależy od rozmiarów metylacji. Niemetylowane „nieczynne” kopie mogą być usuwane, jak w przypadku rozproszonych elementów, u *C. melo* (33). Wobec tego zmiana stanu metylacji DNA byłaby wynikiem jego przebudowy (amplifikacji) lub przyczyną, zależnie od okoliczności. Czy metylacja może wywoływać amplifikację? Arnholdt – Schmitt i inni (3), nie stwierdzili takiego związku. Z kolei wyniki Reeda i Wernsmanna, (85) wykazujące amplifikację DNA pod wpływem auksyn sugerują istnienie takiego związku.

W wyniku kultury *in vitro* zachodzą zjawiska, których wyjaśnić inaczej jak zmianami metylacji (ewentualnie niekiedy amplifikacją) na razie się nie da. Należą do nich, wspomniana już masowa zmienność cech ilościowych polegająca na zwiększeniu zarówno wariancji, jak również średnich w somaklonach (nagła jednorazowa zmiana) i to często w pokoleniu regenerantów, pojawianiu się z bardzo dużą częstotliwością mutacji dominujących, homozygotycznych, uzyskiwanie zjawiska heterozji w krzyżówkach somaklonów z formami wyjściowymi, jak się przypuszcza, w wyniku aktywacji dominujących lub epistatycznych alleli (78,81), pojawianie się białek genów normalnie zablokowanych (17 i 20, za 81). Metylacja, jak się wydaje, jest przyczyną regulacji genów, epimutacji i bezpośrednią lub pośrednią przyczyną wielu mutacji.

## Literatura

1. Anderson S., Levis-Smith A. C., Smith S. M., (1990), *Pl. Cell Rep.*, 8, 554–557.
2. Armstrong K. C., Nakamura C., Keller W. A., (1983), *Z. Pflanzentcht.*, 91, 233–245.
3. Arnholdt-Schmitt B., Holzapfel B., Schillinger A., Neuman, K.-H., (1991), *Theor. Appl. Genet.* 82, 283–288.
4. Ashmore S. E., Gould A. R., (1981), *Protopl.*, 106, 297–308.
5. Biedler J. L., (1982), in: *Gene amplification*. Ed. R. T. Schimke, 39–45, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
6. Blundy K. S., Cullis C. A., Hepburn A. G., (1987), *Pl. Mol. Biol.* 8, 217–901.
7. Borisjuk N. V., Momot V. P., Gleba Y., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 76, 108–112.
8. Breiman A., Felsenburg T., Galun E., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 73, 827–831.
9. Brettell R. I. S., Dennis E. S., Scowcroft W. R., Peacock W. J., (1986a), *Mol. Gen. Gen.*, 202, 235–239.
10. Brettell R. I. S., Pallotta M. A., Gustafson J. R., Apples R., (1986b), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 637–643.
11. Brettell R. I. S., Dennis E. S., (1991), *Mol. Gen. Gen.*, 229, 365–372.
12. Brookfield J. F. Y., (1991), *Genetics*, 128, 471–486.
13. Brown P. T. H., (1981), *Science*, 211, 667.
14. Brown P. T. H., (1989), *Genome*, 31, 717–729.
15. Brown P. T. H., Kyojuka J., Sukekiyo Y., Kimura Y., Shimamoto K., Lorz H., (1990), *Mol. Gen. Gen.*, 223, 324–328.
16. Chandler V. L., Walbot V., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 1767–1771.
17. Chestnut R. S., Shotwell M. A., Boyer S. K., Larkin B. A., (1989), *The Pl. Cell*. Za: Phillips R. L., Kaeppler S. M., V. M. Peschke, (1990), *Prog. P. Cell. and Molec. Biol.*, *Proc. VII<sup>th</sup> Int. Con. on Pl. Tissue and Cell Cult.* Amsterdam 24–29 June (1990), Eds. H. I. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas, J. Van Aartijk Kluwer Acad. Publ., Dordrecht(Boston) London, 131–141.
18. Cullis C. A., (1979), *Heredity*, 42, 237–246.
19. Cullis C. A., Charlton L., (1981), *Pl. Sci. Lett.*, 20, 213–217.
20. Dahlen L., (1989), Ph.D. Thesis, University of Minnesota. Za: Phillips R. L., Kaeppler S. M., Peschke V. M., (1990), *Prog. P. Cell and Molec. Biol.*, *Proc. VII<sup>th</sup> Int. Con. on Pl. Tissue and Cell Cult.* Amsterdam 24–29 June (1990), Eds. H. I. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas, J. Van Aartijk Kluwer Acad. Publ. Dordrecht(Boston) London, 131–141.

21. Dhar M. S., Pethe V. V., Gupta V. S., Ranjekar P. K., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 80, 402–408.
22. DePaepe R., Prat D., Huguët T., (1982), *Pl. Sci. Lett.*, 28, 11–28.
23. Deumling B., Clermont L., (1989), *Chromosoma*, 97, 439–448.
24. Donn G., Tischler E., Smith J. A., Goodman H. M., (1984), *J. Mol. Appl. Genet.*, 2, 621–635.
25. Evans D. A. Sharp W. R., (1983), *Science*, 221, 949–951.
26. Evans N. E., Foulger D., Farrer L., Bright S. W. J., (1986), *Euphytica*, 35, 353–361.
27. Evans A. E., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 5, 46–50.
28. Evola S. V., Tuttle A., Burr F. A., Burr B., (1985), *First Int. Congr. Plant Mol. Biol. Savanah (Abstr.)*, 10.
29. Freeling M., (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 277–298.
30. Gaj M., (1986), *rozprawa doktorska US, Katowice*.
31. Gavazzi G., Tonelli C., Todesco G., Arreghini E., Raffaldi F., Vecchio F., Barbuzzi G., Biasini M. G., Sala S., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 24, 733–738.
32. Golden J. W., Robinson S. J., Haselkorn R., (1985), *Nature*, 314, 419–423.
33. Grisvard J., Seignac M., Chateau M., Branchard M., (1990), *Changes Pl. Science*, 72, 81–91.
34. Groose R. W., Bingham E. T., (1986a), *An unstable anthocyanin*, *Pl. Cell Rep.*, 5, 104–107.
35. Groose R. W., Bingham E. T., (1986b), *Pl. Cell Rep.*, 5, 108–110.
36. Heinz D. J. Mee G. W. P., (1969), *Crop Sci.*, 9, 346–348.
37. Heinz D. J. Mee G. W. P., (1971), *Amer. J. Bot.*, 58, 257–262.
38. Hapburn A. G., Clarke L. E., Pearson L., White J., (1983), *J. Mol. Appl. Gen.*, 2, 315–329.
39. Hepburn A. G., Belanger F. C. Mattheis J. R., (1987), *Develop. Gen.*, 8, 475–493.
40. Hergersberg M., (1991), *Experientia*, 47, 1171–1185.
41. Holliday R., (1987), *Science*, 238, 163–170.
42. Jackson J. A., Fink G. R., (1981), *Nature*, 292, 306–311.
43. Jackey P. B., Beek B., Sutherland G. R., (1983), *Science*, 220, 69–70.
44. James M. G. Stadler J., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 383–393.
45. Janion C., (1987), *Biologia molekularna. Informacja genetyczna*, PWN, Warszawa, 463–486.
46. Johnson S. S., Phillips R. L., Rines H. W., (1987a), *Genome*, 29, 431–438.
47. Johnson S. S., Phillips R. L., Rines H. W., (1987b), *Genome*, 29, 439–446.
48. Karp A., (1991), *Molec and Cell Biol.*, 7, 1–58.
49. Kelly D. E., Pollok B. A., Atchison M., Prry R. P., (1988), *Mol. Gen. Gen.*, 8, 930–937.
50. Kuck U., Kappelhoff B., Esser K., (1985), *Curr. Genet.*, 10, 59–67.
51. Kleckner N., Morisato D., Roberts D., Bender J., (1984), *Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. V. XLIX*, 235–244.
52. Klein H. T., Petes T. D., (1981), *Nature*, 289, 144–148.
53. Kunz B. A., Haynes R. H., (1982), *Mut. Res.*, 93, 353–375.
54. Landsman J., Uhrig, (1985), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 500–505.
55. Lapitan N. L. V., Sears R. G., Gill B. S., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 68, 547–554.
56. Larkin P. J. Scowcroft W. R., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197–214.
57. Larkin P. J., Ryan S. A., Brettell R. I. S. Scowcroft W. R., (1984), *Theor. Appl. Genet.*, 67, 446–455.
58. Larkin P. J., (1987), *Iowa State J. of Res.*, 6, 393–434.
59. Lassner M., Dvorak J., (1986), *Nuc. Acid Res.*, 14, 5499–5512.
60. Lee M., Phillips R.L., (1988), *Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.*, 39, 413–437.
61. Lörz H. Scowcroft W. R., (1983), *Theor. Appl. Genet.*, 66, 67–75.
62. Lorz H., Brown P. T. H., (1986), *Genet. Manipul. in Pl. Breed. Eds Horn W., C. J. Jensen, W. Oodenbach, O. Schieder*, 513–534.
63. Lörz H., (1990), *Botanikertagung Regens–Regensburg*, 30.9 – 5.10., p.45.
64. Lima-de-Faria A., (1969), *Handbook of Mol. Cytol. Ed. Lima-de-Faria*, Amsterdam/London, 234–282.
65. Lin L.-S., Ho T. D., Harlan J. R., (1985), *Dev. Genet.*, 6, 101–112.
66. Loh W. H.-T., Kut S. A., Evans D. A., (1987), *Molecular strategies for crop protection. Ed. C. J. Arntzen, and C. Ryan*, 367–373.
67. LoSchiavo F., Pitto L., Guliano G., Tori G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 325–331.
68. Malepszy S. Nadolska-Orczyk A., (1989), *Pl. Breed.*, 102, 72.
69. Malepszy S., Raczynski K., (1992), *Fifth EUCARPIA Cucurbitaceae Symp. Skierniewice July 27–31*, 95–97.
70. Matzke M. A., Priming M., Trnovsky J., Matzke A. J. M., (1989), *The EMBO J.*, 8, 643–649.

71. McClintock B., (1951), Cold Spring Harbor Quant. Biol., 16, 13-47.
72. McClintock B., (1956), Carnegie Inst. Washington Year Book, 55, 323-332.
73. McClintock B. (1984), Science, 226, 792-801.
74. McCoy T. J., Phillips R. L., Rines H. W., (1982), Can. J. Genet. Cytol., 24, 37-50.
75. Morrish F. M., Vasil I. K., (1989), Pl. Physiol., 90, 37-40.
76. Muller E., Brown P. T. H., Hartke S., Lorz H., (1990), Theor. Appl. Genet., 80, 673-679.
77. Murata M., Orton T. J., (1984), J. Hered., 75, 225-228.
78. Oono K., (1985), Mol. Gen. Gen., 198, 377-384.
79. Peschke V. M., Phillips R. L., Gegenbach B. G., (1987), Science, 238, 804-807.
80. Peters T., Fink G. R., (1982), Nature, 300, 216-217.
81. Phillips R. L., Kaeppler S. M., Peschke V. M., (1990), Prog. P. Cell. Molec. Biol., Proc. VII<sup>th</sup> Int. Con. on Pl. Tissue and Cell Cult. Amsterdam 24-29 June. Ed. H. I. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas, J. Van Aartijk. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht/Boston/London, 131-141.
82. Planckaert F., Walbot V., (1989), Genetics, 123, 635-642.
83. Przybecki Z., (1992), praca habilitacyjna.
84. Putrament A., (1987), Biologia molekularna. Informacja genetyczna, PWN, Warszawa, 411-432.
85. Reed S. M., Wernsmann E. A., (1989), Crop Sci., 29, 1072-1097.
86. Rhoades M. M., Dempsey E., (1971), Genetics, 71, 73-96.
87. Rode A., Hartmann C., Benslimane A., Picard E., Quetier F., (1987), TAG, 74, 31-37.
88. Sacristan M. D., (1971), Chromosoma, 33, 273-283.
89. Schimke R. T., Sherwood S. W., Bill A. B., Johnston R. N., (1986), PNAS, USA, 83, 2157-2161.
90. Schneeberger R. G., Cullis C. A., (1991), Genetics, 128, 619-630.
91. Singh R. J., (1986), Theor. Appl. Genet., 72, 710-716.
92. Sree Ramulu K., (1982), Heredity, 49, 319-330.
93. Stabel, (1986), za: Lörz H. Brown P. T. H., (1986), Gen. Manipul., in Pl. Breed. Walter de Gruyter and Co. Berlin, N.Y, 513-534.
94. Staehr M. U., Zsuffa L., Eckenwalder J., (1988), Amer. J. Bot., 75, 594-597.
95. Steinrucken H. C., Schulz A., Amrhein N., Porter C. A., Frely T. T., (1986), Arch. Bioch. Bioph., 244, 169-178.
96. Swain J. L., Steward T. A., Leder P., (1987), Cell, 50, 719-727.
97. Szostak J. W., Wu R., (1979), Nature, 284, 426-430.
98. Tewari R., Juyal R. C., Thelma B. K., Das B. C., Rao S. R. V., (1987), Cytogenet. Cell Genet., 44, 11-17.
99. Vergara R., Verde F., Pitto L., LoSchiavo F., Terzi M., (1990), Pl. Cell Rep., 8, 697-700.
100. Wiebaur K., Jiricny J., (1989), Nature, 339, 236-236.
101. Wiebaur K., Jiricny J., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 5842-5845.
102. Windle B., Draper B. W., Yin Y., O'Gorman S., Wahl G. M., (1991), Genes Develop., 5, 160-174.
103. Xiao W., Saxena P. K., King J., Rank G. H., (1987), Theor. Appl. Genet., 74, 417-422.
104. Zheng K. L., Castiglione S., Biasini M. G., Biroli A., (1987), Theor. Appl. Genet., 74, 65-70.
105. Mikus M. D., Petes T. D., (1982), Genetics, 101, 369-404.

### Summary

The variability, to be appeared as an in vitro culture result has been called somaclonal variation, and occurred to be serious problem for wide sense biotechnology of plants. The variability has been obtained, can be both, genetical or epigenetical nature. The wide changes induced by in vitro culture factors have been causes of that phenomenon, mainly during "unorganized" growth faze. The advances in molecular investigations of somaclonal variation, to be obtained for the last few years, allowed to find some processes could be responsible for somaclonal variation appearing. At present, the main phenomenons leading to appearance of the somaclonal variation have been thought: changes of methylation pattern, amplification and deamplification of DNA, nucleotide pull imbalance, late replication of chromatin, transpozons, and different type of recombinations.

### Adres dla korespondencji:

Z. Przybecki, S. Malepszy, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.