



Zróznicowany poziom mutacji punktowych i chromosomowych u regenerantów z kultury tkankowej *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Danuta Nabiałkowska¹, Iwona Szarejko¹, Dorota Siwińska²

¹Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice

²Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

Different level of point mutation and chromosomal changes among regenerants in tissue culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Summary

Using the regeneration method described by Feldman and Marks (1986), the level of somaclonal variation (frequency of gene mutations and chromosomal changes) was determined in *A. thaliana* regenerants from root and shoot explants. The explants were regenerated *via* indirect organogenesis with callus stage. The level of embryo lethal mutations and changes in chromosome number were estimated in R₂ generative progeny of regenerants, and confirmed in R₃ generation. The frequency of R₁ plants carrying gene mutations was similar for all types of explants and on average it reached 8.3%, however only 47% of R₁ plants showed the presence of the same embryo mutation in R₂ and R₃ generation. The frequency of embryo-lethal mutants, among 25 571 embryos tested, was 1.7%, while 0.08% embryos carried chlorophyll mutations. The plants with increased chromosome number were observed in the progeny of 32.2 % R₁ regenerants, i.e. with eight times higher frequency than regenerants carrying gene mutations. All polyploid plants were obtained from shoot explants, while regenerants from roots carried normal diploid number of chromosomes. The observed changes in chromosome number were discussed in relation to the different content of DNA in root and shoot cells of *A. thaliana*.

Key words:

somaclonal variation, embryo lethal mutations, polyploidy.

Adres do korespondencji

Danuta Nabiałkowska,
Katedra Genetyki,
Wydział Biologii i Ochrony
Środowiska,
Uniwersytet Śląski,
ul. Jagiellońska 28,
40-032 Katowice;
e-mail:
dnabialk@us.edu.pl

biotechnologia

2 (65) 79–85 2004

1. Wstęp

Już w latach sześćdziesiątych regenerowano rośliny *Arabidopsis thaliana* z różnych jej organów. Zastosowanie nowych rodzajów pożywek i kombinacji hormonów umożliwiło zwiększenie efektywności regeneracji i otrzymanie typowych, płodnych roślin, nadal jednak wśród regeneratów obserwowane jest zjawisko zmienności somaklonalnej. Zmienność ta może być związana z obecnością mutacji w tkankach eksplantatów bądź wynikać z mutagenicznego działania samej kultury (1). Istnieje wiele różnych mechanizmów będących przyczyną pojawiającej się zmienności w kulturze, wśród nich wyróżnić można mutacje punktowe wywołane różnymi związkami chemicznymi wchodzącymi w skład pożywek, zmiany w liczbie i strukturze chromosomów, aktywację transpozonów, metylację DNA i związaną z tym modyfikację ekspresji genów, wymianę odcinków siostrzanych chromatyd, oraz zmiany zawartości DNA komórkowego w wyniku amplifikacji lub deamplifikacji sekwencji DNA (2-4).

Zmiany w liczbie i strukturze chromosomów są najczęściej opisywanym typem mutacji pojawiającym się w kulturach *in vitro*. Wśród roślin zregenerowanych z kultury kalusowej obserwowano poliploidy, aneuploidy, a także delecje, inwersje i translokacje (2). Zmienność somaklonalna u regeneratów w postaci mutacji punktowych dotyczyła zmian w jednej lub kilku sąsiadujących ze sobą par zasad w DNA, a obserwowane mutacje miały charakter dominujący bądź recesywny (5,6). Pomimo istnienia obszernej literatury dotyczącej badania zmienności somaklonalnej u roślin *A. thaliana* zregenerowanych w kulturze *in vitro*, nie przeprowadzono dotąd analizy porównawczej częstotliwości mutacji punktowych i chromosomowych u regeneratów otrzymanych z tkanek pochodzących z części podziemnych i nadziemnych roślin. W pracy przedstawiono poziom zmian somaklonalnych u regeneratów z korzenia i pędu *A. thaliana*, na podstawie częstości występowania letalnych mutacji zarodkowych oraz roślin o zmienionej liczbie chromosomów, a także podjęto próbę wyjaśnienia źródeł występowania obserwowanej zmienności.

2. Materiał i metody

Eksplantaty w postaci fragmentów korzenia i łodygi pobierano z roślin *Arabidopsis thaliana*, genotypu C-24, rosnących w warunkach sterylnych. Metoda regeneracji *in vitro* opracowana przez Feldmanna i Marksa (7) jest obecnie powszechnie używana w badaniach wykorzystujących kultury *in vitro* roślin *A. thaliana*. Zregenerowane rośliny R₁ analizowano stosując test Müllera (8) w celu stwierdzenia obecności letalnych mutacji zarodkowych. Zmutowane zarodki różniły się od zarodków kontrolnych wielkością, kształtem i barwą. W zależności od obserwowanych zmian wyróżniono niechlorofilowe, letalne mutacje zarodkowe i chlorofilowe mutacje zarodkowe. Do analizy pobierano od 3 do 5 łuszczyń z każdej rośliny R₁. W celu potwierdzenia dziedzicz-

nego charakteru obserwowanych zmian, przeprowadzono powtórny analizę zarodków w następnym pokoleniu (R_2).

Analizę liczby chromosomów przeprowadzono w pąkach roślin stanowiących potomstwo wybranych roślin R_1 , a także w merystemie korzeniowym roślin R_3 będących kolejnym pokoleniem generatywnego potomstwa roślin R_1 . Pąki i siewki pobrane do badań utrwalano w roztworze Carnoya i przechowywano w temp. -24°C , a następnie barwiono, po odpowiednim przygotowaniu, metodą DAPI (9).

W celu sprawdzenia poziomu ploidalności w tkankach roślin *A. thaliana* nie przechodzących przez stadium kultury *in vitro*, zawiesiny komórek przygotowane z fragmentów korzenia i łodygi analizowano z użyciem cytometru przepływowego (DAKO Galaxy flow cytometer). Dla każdej próbki zawierającej tkankę z kilkunastu roślin znajdujących się w tym samym stadium rozwojowym, analizowano po ok. 10 000 jąder.

3. Wyniki i dyskusja

Poziom zmienności somaklonalnej został określony dla roślin R_1 zregenerowanych z eksplantatów korzenia i łodygi. U roślin tych częstotliwość mutacji punktowych określono na podstawie frekwencji zmutowanych zarodków. Analiza 762 roślin R_1 wykazała obecność 8,3% roślin, które posiadały zarodki o zmienionej morfologii w stosunku do zarodków kontrolnych (tab. 1), sklasyfikowane jako zarodki letalne chlorofilowe (fot. 1) i niechlorofilowe (fot. 2). Badania tych roślin w następnym pokoleniu potwierdziły dziedziczny charakter obserwowanych zmian tylko dla 47,0% roślin R_1 niosących letalne zarodki (tab. 2). Dlatego faktyczny poziom mutacyjnych zmian wywołanych działaniem kultury *in vitro* dla badanych eksplantatów można oszacować jako 3,9% R_1 niosących letalne mutacje zarodkowe. Wynik ten wskazuje na niewielki poziom pojawiających się mutacji punktowych, chociaż w porównaniu do poziomu spontanicznych zmian, jakie otrzymano u roślin rozmnożonych bezpośrednio z nasion (1,7%), wartość ta była ponad dwukrotnie wyższa (tab. 1). Średnia częstotliwość łuszczyn z mutacjami dla badanych eksplantatów wynosiła 6,9% i była nieznacznie niższa niż średnia częstotliwość roślin niosących mutacje (tab. 1). Wynik ten wskazuje na chimeralność regenerantów – nie każda łuszczyzna z rośliny niosącej mutacje posiadała zmienione zarodki. Nie obserwowano zróżnicowania w poziomie zmian mutacyjnych w zarodkach pomiędzy regenerantami korzenia jak i tych zregenerowanych z łodygi znacznie częściej obserwowano letalne mutacje niechlorofilowe niż mutacje chlorofilowe (tab. 3).

Tabela 1

Częstotliwość roślin R_1 z letalnymi zarodkami, otrzymanych z różnych typów eksplantatów

Typ eksplantatu	Liczba analizowanych roślin R_1	Rośliny z mutacjami		Liczba analizowanych fuszczyń	Fuszczyzny z mutacjami	
		liczba	% \pm SD		liczba	% \pm SD
korzeń	450	32	7,1 \pm 6,7	1077	57	5,3 \pm 4,4
łodyga	312	31	9,9 \pm 4,0	708	67	9,4 \pm 0,9
razem/średnia	762	63	8,3	1785	124	6,9
rośliny otrzymane z nasion	110*	2*	1,7 \pm 0,2	266*	3*	1,1 \pm 0,6

*kontrolne rośliny lub fuszczyzny *A. thaliana*, których zarodki powstały w wyniku samozapylenia u roślin rozmnażanych generatywnie; SD – odchylenie standardowe

Tabela 2

Częstotliwość roślin R_1 z mutacjami potwierdzonymi w pokoleniu R_3

Typ eksplantatu	Liczba roślin analizowana w pokoleniu R_2	Liczba i procent roślin R_1 wykazująca obecność mutacji zarodkowych w pokoleniu R_3	
		liczba	(%)
korzeń	32	20	62,5
łodyga	19	4	21,0
Razem	51	24	47,0

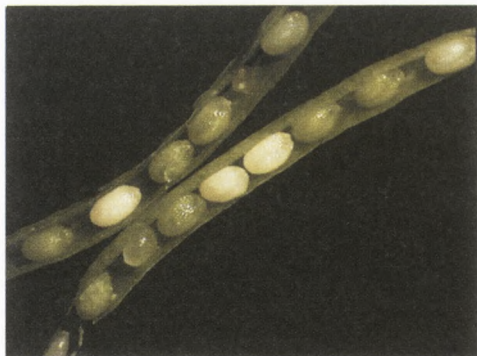
Tabela 3

Procentowy udział zmutowanych zarodków w fuszczyinach roślin R_1

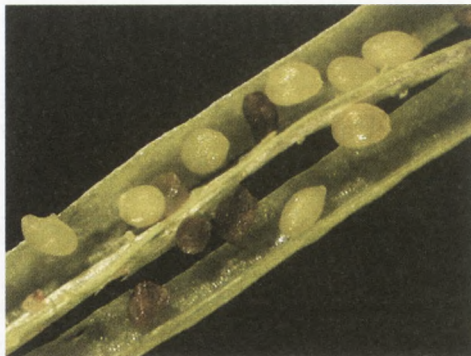
Typ eksplantatu	Liczba analizowanych zarodków	Częstotliwość zmutowanych zarodków		
		mutacje chlorofilowe % \pm SD	letalne mutacje niechlorofilowe % \pm SD	Razem % \pm SD
korzeń	17015	0,05 \pm 0,0	1,6 \pm 0,7	1,6 \pm 0,6
łodyga	8556	0,11 \pm 0,2	1,8 \pm 0,9	1,9 \pm 1,0
razem/średnia	25571	0,08	1,7	1,7
rośliny otrzymane z nasion	1257*	0,00 \pm 0,0	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5

* kontrolne rośliny lub fuszczyzny *A. thaliana*, których zarodki powstały w wyniku samozapylenia u roślin rozmnażanych generatywnie; SD – odchylenie standardowe

W potomstwie 32 roślin R_1 analizowano poziom zmian w liczbie chromosomów. Obserwacje przeprowadzono u 91 roślin R_2 stanowiących generatywne pokolenie roślin R_1 . Częstotliwość roślin R_1 o tetraploidalnej liczbie chromosomów wynosiła 29%, jednakże regeneranty ze zwiększoną liczbą chromosomów pochodziły jedynie

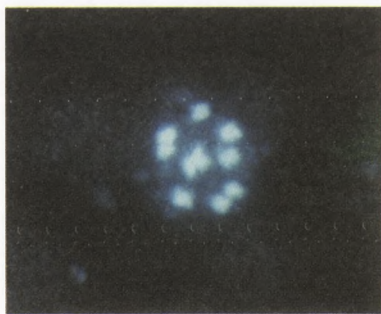


Fot. 1. Nasiona R₂ w łuszczyńce rośliny R₁ segregujące pod względem zarodkowej mutacji chlorofilowej.

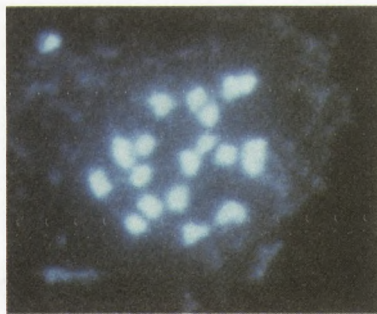


Fot. 2. Nasiona R₂ w łuszczyńce rośliny R₁ segregujące pod względem mutacji niechlorofilowej.

z eksplantatów łodygowych (tab. 4). Wszystkie analizowane rośliny zregenerowane z eksplantatów korzeniowych charakteryzowały się normalną, diploidalną liczbą chromosomów (tab. 4) (fot. 3). Również wśród roślin R₁ zregenerowanych z fragmentów łodygi znaleziono chimeralną roślinę, której potomstwo było zarówno dijak i tetraploidalne. Niestabilność chromosomowa jest powszechnym zjawiskiem w kulturach *in vitro*, także w kulturach tkankowych *Arabidopsis thaliana*. W pracy Gaj i Małuszyńskiego (10) wskazano na obecność 27% zregenerowanych roślin o tetraploidalnej liczbie chromosomów i podobnie jak w tej pracy, zmiany te nie wpłynęły na morfologię i płodność otrzymanych roślin. Regeneranty *A. thaliana* o zwielokrotnionej liczbie chromosomów obserwowała również Fraś (11). Jednakże w obu wspomnianych pracach podczas regeneracji zastosowano metodę, w której wystąpiła długoterminowa faza kalusa. Powszechnie wiadomo, że to właśnie w stadium kalusa następują różnorodne zmiany, których efektem mogą być mutacje chromosomowe.



a



b

5 μ m

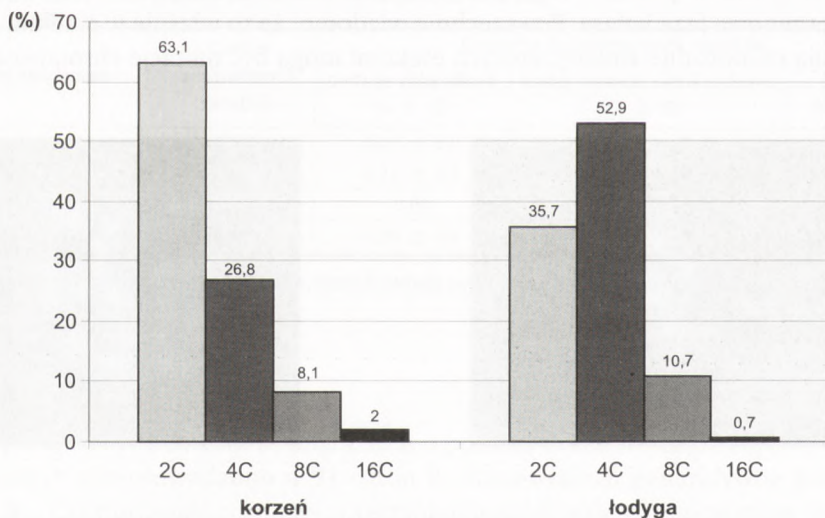
Fot. 3. Chromocentry w jądrach interfazowych *Arabidopsis thaliana*, po fluorescencyjnym barwieniu DAPI: a) diploid, b) tetraploid.

W tej pracy zastosowano metodę regeneracji, w której faza kalusa i kontakt z egzogennymi hormonami ograniczał się najwyżej do 3 tygodni. Fakt ten, podobnie jak wystąpienie poliploidalności tylko wśród roślin zregenerowanych z fragmentów łodygi, może sugerować, że obserwowane mutacje chromosomowe były związane z wystąpieniem zjawiska endoploidalności w tkankach regenerowanych eksplantatów. *Arabidopsis thaliana*, podobnie jak większość roślin okrytonasiennych, jest rośliną polisomatyczną (12), co oznacza, że poszczególne tkanki w roślinie różnią się między sobą poziomem DNA. Eksplantaty pochodzące z różnych organów zawierają komórki o różnej zawartości DNA, co może być przyczyną powstawania miksploidalnego kalusa, a w rezultacie pojawienia się zmienności somaklonalnej u regenerowanych roślin (13).

Tabela 4

Procentowy udział roślin R_1 o zmienionej liczbie chromosomów, zregenerowanych z różnych typów eksplantatów

Typ eksplantatu	Liczba analizowanych roślin R_1	Rośliny diploidalne (2n)		Rośliny tetraploidalne (4n)		Rośliny chimeralne (2n/4n)	
		liczba	(%)	liczba	(%)	liczba	(%)
korzeń	14	14	100,0	0	0,0	0	0,0
łodyga	18	7	41,2	9	52,9	1	5,9
Razem	32	21	67,7	9	29,0	1	3,2



Rys. 1. Poziom DNA w tkankach korzenia i łodygi (2C-16C).

W pracy tej, przy użyciu cytometru przepływowego określono zawartość DNA w komórkach tkanek pochodzących z korzenia i łodygi roślin *A. thaliana*. Eksplantaty z roślin w tych samych stadiach rozwojowych stanowiły materiał wykorzystany w regeneracji *in vitro* w przedstawionych badaniach. Analizie poddano 1,5 cm odcinki korzeni wraz z merystemem wierzchołkowym oraz 1 cm odcinki łodygi, pochodzące z kilkudziesięciu roślin w odpowiednim stadium rozwojowym. Zarówno w korzeniu jak i pędzie zaobserwowano wystąpienie komórek o zawartości DNA od 2C do 16C, jednak udział komórek o określonym poziomie DNA był różny w obu tych organach. W komórkach tkanek korzenia stwierdzono przewagę komórek o zawartości 2C (55,5%), natomiast w tkankach łodygi przeważały komórki o zawartości DNA 4C. Wartości, te wskazują, że zróżnicowanie pod względem ploidalności wśród regenerantów z korzenia i pędu mogło być związane z odmiennym udziałem komórek o różnej zawartości DNA w tkankach tych organów.

Literatura

1. Donini P., Sonnino A., (1998), in: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Eds. Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 255-291.
2. Larkin P. J., Banks P. M., Bhati R., Brettell R. I. S., Davies P. A., Ryan S. A., Scowcroft W. R., Spindel L. H., Tanner J., (1989), *Genome*, 31, 705-711.
3. Gupta K. P., (1998), in: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Eds. Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 149-168.
4. Olhoft P., Phillips R. L., (1995), *Proc. Int. Symp. on „Induced Mutation and Molecular Techniques for Crop Improvement”*, IAEA, Vienna, 19-23 June, 187-198.
5. Brar D. S., Jain S. M., (1998), in: *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Eds. Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 15-37.
6. Skirvin R. M., Coyner M., Norton M. A., Motoike S., Gorvin D., (2000), *AgBiotechNet*, 2 May.
7. Feldmann K. A., Marks M. D., (1986), *Plant Science*, 47, 63-69.
8. Müller H. J., (1963), *Biol. Zbl.*, 82, 133-163.
9. Weiss H., Małuszyńska J., (2001), *Annals of Botany*, 87, 729-735.
10. Gaj M. D., Małuszyński M., (1987), *Arab. Inf. Serv.*, 23, 1-8.
11. Fraś A., (2000), *Poliploidalność w kulturach in vitro Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.*, praca doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice.
12. D'Amato F., (1984), in: *Embriology of angiosperms*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 519-566.
13. Małuszyńska J., Fraś A., (1997), *Zeszyty Naukowe, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja, Kraków*, 318 (50), 13-21.