



Zdolności morfogenetyczne komórki roślinnej i ich genetyczne uwarunkowania

Jan J. Rybczyński, Anna Mikuła

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności
Biologicznej
Polska Akademia Nauk, Warszawa

Morphogenic Potential of Plant Cell and its Genetic Conditions

Summary

The aim of the presented review is to analyse the possibilities of creating highly morphogenic *Triticum aestivum* genome using generative hybridisation of various wheat forms and its relatives.

Key words:

Triticum, genome, hybridization.

1. Wstęp

Biotechnologia, definiowana jako zintegrowane działanie na rzecz wykorzystania potencjału komórki, w przypadku roślin zmierza do uzyskania genetycznie zmodyfikowanego pojedynka lub linii komórkowej o innym wtórnym metabolizmie, w oparciu na jej totipotencji.

Wykorzystanie w warunkach kultur *in vitro* komórki somatycznej i coraz częściej komórek szlaku generatywnego rośliny jako obiektu manipulacji genetycznych mogło nastąpić tylko dzięki postępowi badań nad zdolnościami morfogenetycznymi eksplantatu o różnym poziomie zorganizowania. Pomimo że materiałem eksperymentalnym często bywa wielokomórkowy eksplantat, to jednak pojedyncza komórka była i jest podstawowym adresatem manipulacji genetycznych. Już na początku XX stule-

Adres do korespondencji

Jan J. Rybczyński,
Ogród Botaniczny
– Centrum Zachowania
Różnorodności
Biologicznej PAN,
ul Prawdziwka 2,
02-973 Warszawa.

cia hipoteza Haberlanda zakładała istnienie w każdej komórce roślinnej zdolności do przechodzenia wtórnych podziałów komórkowych, efektem których miała być regeneracja całej rośliny.

W ostatnich dziesięcioleciach w przeprowadzanych eksperymentach w zakresie kultur *in vitro* potwierdzono tę hipotezę i wykazano istnienie wysokiego potencjału morfogenetycznego komórki roślinnej, wyzwolonego poprzez stymulowanie bodźcami egzogennymi ekspresji genów. Najbardziej spektakularnym uwidocznieniem się zdolności morfogenetycznych jest możliwość przejścia komórki szlaku generatywnego na drogę rozwoju wegetatywnego. Konsekwencją ekspresji genów związanych z inicjacją podziałów komórkowych jest regeneracja płodnej rośliny na drodze organogenezy, czy też somatycznej embriogenezy.

W przypadku somatycznej embriogenezy mamy do czynienia z ekspresją jądrowych genów embriogenezy w komórkach, których funkcjonowanie związane jest z wczesnymi stadiami rozwoju rośliny, poczynając od genów kontrolujących pierwszy podział komórkowy funkcjonalnej zygoty. Cechami wyrażającymi ekspresję genów odpowiedzialnych za proces różnicowania roślin drogą embriogenezy somatycznej są: liczba komórek lub mikrospor inicjujących rozwój somatyczny, liczba kulistych wielokomórkowych struktur rozwijających się w zarodki, liczba zregenerowanych roślin zielonych, liczba roślin albinotycznych i stosunek zregenerowanych roślin zielonych do albinotycznych.

Organowy poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie roślin stanowi podstawę alternatywnego do somatycznej embriogenezy systemu ich regeneracji. Proliferacja tkanki kalusowej jako wyraz merystematyczności komórek, morfogeniczność tkanki kalusowej wyrażona tworzeniem centrów merystematycznych, aktywność regeneracyjna opisana udziałem kalusów zdolnych do regeneracji pędów i ostatecznie zdolność pędów do ukorzeniania się stanowią wyraz ekspresji genów odpowiedzialnych za bardziej złożony, etapowy proces regeneracji roślin jakim jest organogeneza.

Zdolności te tradycyjnie są wykorzystywane przez szereg dotychczas rozwiniętych metod modyfikowania genomu rośliny, jak np. 1) krzyżowanie międzyrodzajowe czy międzygatunkowe z kulturą izolowanych zarodków, 2) somatyczna hybrydyzacja o zróżnicowanym poziomie symetryczności, 3) czy ostatnio rozwijana metoda wprowadzania transgenów do komórki roślinnej.

Obserwowany w ostatnich latach postęp w modyfikowaniu genomu roślinnego znajduje swoje odzwierciedlenie we wciąż udoskonalanych metodach wprowadzania obcego materiału genetycznego do komórki biorcy, jak również coraz liczniejszej grupie transformowanych gatunków roślin. W przypadku transformowanej komórki, bez względu na sposób jej modyfikacji podstawowym warunkiem ekspresji wprowadzanego DNA jest system regeneracyjny pozwalający na uwidocznienie się zdolności morfogenetycznych zmodyfikowanego genomu. W warunkach *in vitro* szereg gatunków roślin jednoliściennych określanych jest jako trudne do przeprowadzenia manipulacji genetycznych, o niełatwych warunkach ekspresji genów odpo-

wiedzialnych za indukcję podziałów komórkowych i utrzymanie zdolności morfogenetycznych. Jednakże na podstawie daleko zaawansowanych badań cytogenetycznych mogą one stanowić materiał do śledzenia i kreowania kombinacji genów lub grup genów związanych z totipotencją komórki roślinnej, i w dalszej konsekwencji regeneracją rośliny. Najlepszym przykładem tego typu roślin jest, jak się wydaje, pszenica choćby ze względu na zróżnicowany poziom ploidalności jej gatunków, co jest związane z różnym udziałem genomów A, B i D (tab. 1).

Tabela 1

Nazwa botaniczna, liczba chromosomów oraz konstytucja genomu niektórych przedstawicieli z rodzaju *Triticum*

Botaniczna nazwa gatunkowa	Liczba chromosomów	Skład genomu
<i>T. boeoticum</i>	14	AA
<i>T. monococcum</i>	14	AA
<i>T. dicoccum</i>	28	AABB
<i>T. dicocoides</i>	28	AABB
<i>T. durum</i>	28	AABB
<i>T. persicum</i>	28	AABB
<i>T. polonicum</i>	28	AABB
<i>T. orientale</i>	28	AABB
<i>T. turgidum</i>	28	AABB
<i>T. aestivum</i>	42	AABBDD
<i>T. compactum</i>	42	AABBDD
<i>T. macha</i>	42	AABBDD
<i>T. spelta</i>	42	AABBDD
<i>T. sphaerococcum</i>	42	AABBDD

Źródło eksplantatu – protoplast, komórka, tkanka, organ oraz ich poziom morfogenetycznego zróżnicowania czyli odległości morfogenetycznej od totipotencjalnej zygoty mają niepodważalne znaczenie dla badań nad zdolnościami morfogenetycznymi w warunkach kultur *in vitro*. Opisanie zdolności morfogenetycznych pszenic na bazie zaindukowanych embriogenicznych kultur pochodzących z intensywnie dzielących się komórek skutelum niedojrzałego zarodka przyczyniło się w zasadniczej mierze do postępu w zakresie badań nad regeneracją tej rośliny. Wykazano również, że embriogeniczna zawiesina komórkowa, jak i jej protoplasty, zdolne są do regeneracji roślin (1-4). Wykorzystując wysoki poziom zdolności embriogenicznych kultur inicjowanych niedojrzałym skutelum zdołano rozwinąć efektywny system transformacji pszenicy, opierający się na długoterminowym zachowaniu zdolności regeneracyjnych tkanki kalusowej (5) oraz wykazać na podstawie prowadzonych badań molekularnych stabilną ekspresję transgenów zarówno w protoplastach (6,7), zawieszynie komórkowej, tkankach kalusowych (8), płodnych „T” regenerantach (9-11) oraz kilku potransformacyjnych pokoleniach pszenicy (12).

Zdolności androgeniczne pszenicy heksaploidalnej były obiektem szerokich badań i wiadomo, że zależą one od wielu czynników. Reakcja kultur pylnikowych pszenicy kontrolowana jest zarówno przez czynniki genetyczne jak i środowiskowe z istotną interakcją między nimi. Warunki kultury i fizjologiczna kondycja rośliny – dawcy mają wielkie znaczenie na jakość otrzymywanych mikrospor. Warunki przedtraktowania (chłodzenie), stadium mikrospory oraz warunki kultury i skład pożywki (maltoza, skrobia pszeniczna) są kolejnymi uwarunkowaniami efektywności procesu embriogeniczności na poziomie haploidalnym (13-16). Ostatecznie, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, w których zastosowano wiele form pszenicy stwierdzono, że największy udział w ekspresji androgeniczności ma czynnik genetyczny czyli genotyp (17). Poligeniczny charakter androgeniczności ma jądrowy lub zarówno jądrowy jak i cytoplazmatyczny charakter (18). Zdolności morfogenetyczne tkanki somatycznej uzależnione są głównie od genetycznej konstrukcji pszenicy, o czym świadczy występowanie wielu odmian i linii hodowlanych o wysokich zdolnościach morfogenetycznych zarówno poziomu di-, tetra- i heksaploidalnego.

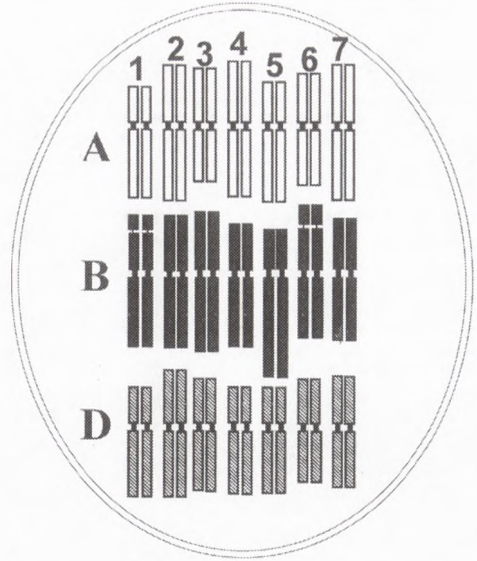
W artykule omówiono przykłady pozwalające na określenie umiejscowienia na chromosomach lub ich ramionach genów lub grup genów odpowiedzialnych za zdolności morfogenetyczne zarówno poziomu haploidalnego jak i diploidalnego pszenicy poprzez analizę reakcji niedojrzałych zarodków, tkanek kalusowych lub pylników pszenic o różnej konstytucji genetycznej w warunkach kultur *in vitro*.

2. Chromosomowa kontrola androgenazy

Rozwinięcie metody hodowli pylników, a następnie izolowanych mikrospor przyczyniło się nie tylko do uzyskania roślin haploidalnych i postępu w pracach hodowlanych nad czystymi liniami dla wszystkich gospodarczo ważnych roślin, ale również do poszerzenia badań genetycznych oraz badań nad relacjami genomowymi. Zastosowanie w badaniach nad zdolnościami morfogenetycznymi mikrospor form aneuploidalnych, substytucji chromosomów oraz linii translokacyjnych pozwala na genetyczną analizę procesu androgenazy.

W kulturach pylnikowych linii pszenicy „Chinese Spring” (CS), uzupełnionych pojedynczym chromosomem każdej z par chromosomów żyta, procent pylników produkujących oraz procent kalusów regenerujących pędy zależny był od genotypu. Rozpatrując obie te cechy najlepsze wyniki zostały uzyskane w przypadku linii zawierającej chromosom 4R. Jednakże pozostałe linie reagowały podobnie jak CS. W linii zawierającej chromosomy 1R większy procent pylników tworzył kalus niż w liniach CS zawierających 2R, 3R, 6R lub 7R. Wykazano również, że w przypadku aneuploidalnej linii CS + 4R obserwowano największą reakcję, co może wskazywać, że większość genów inhibujących reakcję kultur pylnikowych znajduje się w grupie czwartej chromosomów genomu pszenicy (19).

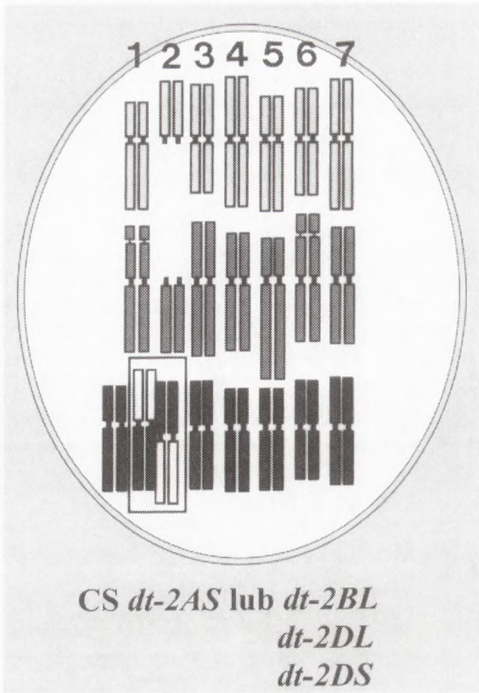
Rys. 1. Schemat obrazujący chromosomową budowę płytki metafazalnej pszenicy *Triticum aestivum*, var. „Chinese Spring” ($6n = 42$) zawierającej genom AABBDD.



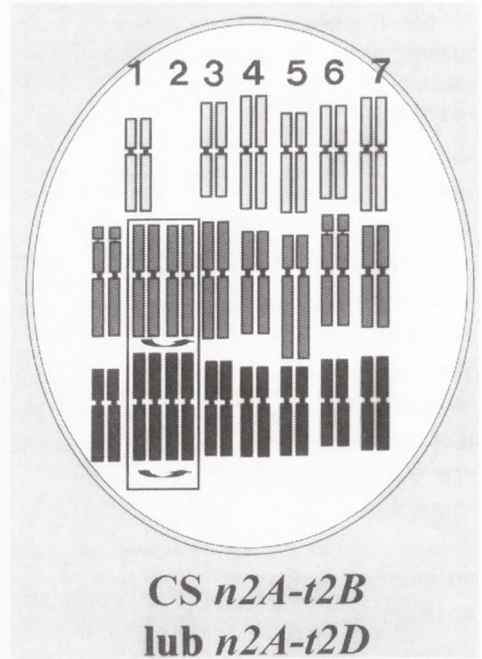
Chinese Spring $6x = 42$

W przypadku *Triticum durum* w przeprowadzonych badaniach wykazano, że uzyskanie roślin haploidalnych może być indukowane w alloplazmatycznych tetraploidalnych pszenicach, jako wynik interakcji cytoplazmy *Aegilops kotschy* i chromosomowej translokacji 1BL/1RS (20). W dodatkowych badaniach nad genetycznym mechanizmem indukcji haploidyacji wykazano, że produkcja haploidów zależy od obecności cytoplazmy indukującej partenogenezę i genu jądrowego opisanego jako *Ptg* (genu partenogenezy) ulokowanego na krótkim ramieniu 1R chromosomu i nieobecności innego genu jądrowego *Spg* (gen supresji partenogenezy) zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 1B pszenicy, a który w formie heterozygotycznej (*SpgRfv/Ptg*) mógłby być odpowiedzialny za wysoką produkcję haploidów (21). Geny ulokowane na chromosomie 1D „Chinese Spring” i ramieniu chromosomu 5BL tej pszenicy podnosiły częstotliwość tworzenia zarodków pochodzenia mikrosporowego. Okazało się również, że gen lub geny związane ze zdolnościami regeneracyjnymi są ulokowane na ramieniu 1RS chromosomu mieszańców F1 heterozygotycznych dla chromosomu 1B (1BL-1BS/1BL-1RS). Wykazano również, że gen odpowiedzialny za wzrost częstotliwości występowania form albina jest ulokowany na chromosomie 5B (22).

We wcześniejszych eksperymentach z heksaploidalnymi pszenicami wykazano, że odmiany „Clement” czy „Aurora” z translokacją chromosomu 1BL/1RS posiadały tak wysokie zdolności morfogenetyczne pozwalające na uzyskanie podwojonej wartości współczynnika regeneracji w stosunku do niestranslokowanych form rodzicielskich. Ten fakt wskazuje, że geny lub geny związane ze zdolnościami morfogenetycznymi znajdują się mogą na ramieniu krótszym 1R chromosomu (23).



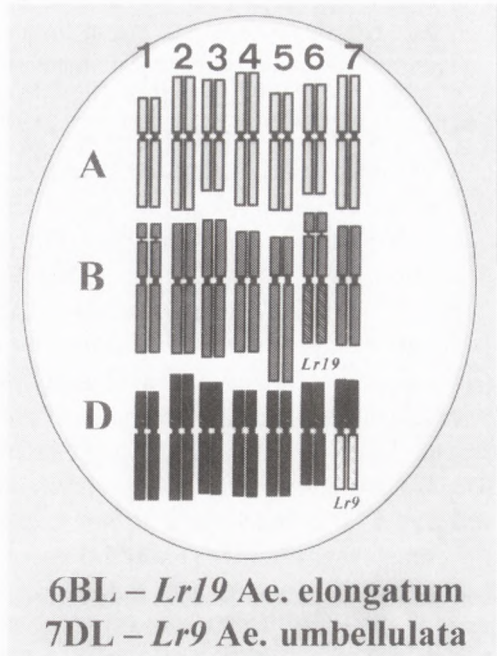
Rys. 2. Schemat obrazujący formę ditelosomiczną pszenicy „Chinese Spring” dla chromosomów grupy drugiej.



Rys. 3. Schemat obrazujący formy ditelosomiczne i nulli-tetrasomiczne pszenicy „Chinese Spring”.

Negatywny wpływ translokacji poprzez supresję indukcji zarodków w chromosomie 6B i 7DL wykazano w kulturze pylników izogenicznych linii mających translokacje pochodzące od *Ae. umbellulatum* (gen *Lr 9*) oraz od *Ae. elongatum* (gen *Lr 19*). Supresja indukcji zarodków haploidalnych może być również tłumaczona poprzez występowanie innych genów, które są bardzo blisko ułożone w stosunku *Lr 9* i *Lr 19*. Alternatywnym wytłumaczeniem może być brak tych chromosomów pszenicy, które zostały podstawione przez fragmenty *Ae. umbellulatum* i *Ae. elongatum*, co negatywnie wpłynęło na produkcję zielonych roślin. Wprowadzenie do eksperymentu linii mieszańców F1 pszenic o znanym kompleksie genów, jak np. (*Lr19 + Rht*)/(*Ppd 1 + Ppd2*) oraz (*Pro1 + Pro*)/(*Lr19 + Rht1*) pozwoliło określić ich funkcjonowanie w indukcji zarodków haploidalnych oraz regeneracji zarówno zielonych jak i albinotycznych roślin. W kulturach z kompleksem genów (*Pro1 + Pro*)/(*Lr19 + Rht1*) wykazano wyższą zdolność indukowania zarodków i regeneracji zielonych roślin niż w kulturach zawierających kompleks genów (*Lr19 + Rht*)/(*Ppd 1 + Ppd2*), jakkolwiek uzyskane rezultaty nie przewyższały reakcji kultur pylnikowych form izogenicznych linii wyjściowych. Wyniki te zasługują na szczególną uwagę ze względu na ważność i częste manipulowanie tymi genami w programach hodowlanych pszenic.

Rys. 4. Schemat pokazujący substytucję ramienia długiego chromosomu szóstego „Chinese Spring” przez chromosom *Aegilops elongatum* zawierający gen *Lr 19* dla genomu B i chromosomu siódmego przez chromosom *Aegilops umbellulata* zawierającego gen *Lr9* dla genomu D.



W substytucji chromosomów „Chinese Spring” przez kolejno podstawiane chromosomy odmiany „Cheyenne” wykazano, że indukcja tkanki kalusowej, całkowita regeneracja roślin i regeneracja zielonych roślin są poligenicznie określone, a ich dziedziczenie jest niezależne między sobą. Substytucja chromosomów 7A i 1B przyczyniała się do najniższej częstotliwości tworzenia tkanki kalusowej, natomiast najwyższy procent uzyskano w obecności substytucji 7A, 4A, 4B oraz 1A. Bogata regeneracja roślin skorelowana była z substytucją następujących chromosomów: 3A oraz 5B, podczas gdy silny efekt obniżenia zdolności regeneracyjnych związany był z takimi chromosomami jak: 4D, 3B i 3D. Różnicowanie roślin zielonych daje nam inny obraz zaangażowania chromosomów, szczególnie, że aż 7 z 21 linii nie wykazywało zdolności do regeneracji zielonych roślin. Zdolności regeneracyjne prowadzące aż do uzyskania zielonych roślin związane były z chromosomem 2D, którego wpływ był najsilniejszy i nawet silniejszy niż chromosomu 1D.

Inną możliwością określenia genetycznych zależności w kierowaniu zdolnościami morfogenetycznymi jest „dodawanie” genomu diploidalnego do tetraploidalnego. Ażeby się przekonać w jaki sposób współdziałają poszczególne genomy pszenicy tetraploidalnej z diploidalnym genomem *Triticum tauschii* (DD), tworzące syntetyczne linie pszenicy heksaploidalnej, eksperymenty prowadzono z następującymi genotypami pszenicy tetraploidalnej:

- Tetra „Tacher” (AABB),
- Triticum durum* gulab (AABB),
- Triticum persicum straminum* (AABB),

oraz ich mieszciami z *Triticum tauschii* (DD).

Genom DD w syntetycznych liniach uzyskanych heksaploidalnych pszenic powodował zróżnicowanie ich pod względem czterech podstawowych cech androgenozy. W kulturach tych wykazano, że istniejące zróżnicowanie heksaploidalnych i tetraploidalnych pszenic zachodzi dla wszystkich etapów procesu różnicowania haploidalnej rośliny, tj. indukcji zarodków, regeneracji roślin zielonych i albinotycznych oraz stosunku zregenerowanych roślin zielonych do albinotycznych. Syntetyczny, heksaploidalny „Tacher”, jak się okazało, był najlepszą formą spośród badanych form heksaploidalnych ponieważ dawał najwięcej zarodków i zielonych roślin. Uzupełnienie genomem „D” *T. tauschii* tetraploidalnej pszenicy *T. persicum straminum* miało pozytywny i statystycznie istotny wpływ na wszystkie wymienione i rozpatrywane cechy. Jednakże, w przypadku *T. durum galub* dodany genom „D” nie miał jakiegokolwiek pozytywnego wpływu na androgenezę. Pozytywny efekt genomu „D” na zdolności androgeniczne jednej tetraploidalnej linii oraz brak tego efektu u innej wskazywać może na współdziałanie każdego z genomów (A, B i D) osobno, wpływu ich cytoplazmy i ich wzajemnych interakcji (24).

3. Chromosomowa kontrola zdolności morfogenetycznych tkanki somatycznej

Uzupełnienie genomu „Chinese Spring” poprzez wprowadzenie chromosomu każdej pary genomu żyta wykazano, że linie CS uzupełnione chromosomami 3R i 4R tworzą najwyższy procent kalusujących, niedojrzałych zarodków, jakkolwiek nie stwierdzono znaczących różnic w produkcji kalusa. Najwyższą częstotliwością regeneracji pędów charakteryzowała się tkanka kalusowa linii CS + 6R i kolejno linii CS + 7R. Chromosomy 6 i 7 żyta zawierają geny, które pozytywnie, jak się wydaje, wpływają na regeneracyjną reakcję kultur niedojrzałych zarodków lub osłabiają efekty genów negatywnych ulokowanych w genomie pszenicy. Natomiast mała liczba zarodków regenerowanych w kulturze linii CS+2R wcale nie pozwala na konkluzję, że chromosom 2R ma negatywny wpływ na regenerację (19).

Zastosowanie krzyżowania amerykańskich pszenic m.in. serii monosomicznej „Wichita” o małej zdolności morfogenetycznej z genotypem o wysokich zdolnościach regeneracyjnych „DN” pozwoliło na wykazanie, na którym chromosomie formy morfogenetycznej znajdują się genetyczne czynniki kontrolujące formowanie kalusa o zdolnościach regeneracyjnych oraz kontrolujące jego wzrost. Wykazano, że chromosom 2D był znaczącym chromosomem posiadającym locus lub loci formowania regenerującego kalusa niedojrzałego zarodka w przeciwieństwie do chromosomu 4B, który był znaczący dla pszenic europejskich. Intensywny wzrost kalusa skorelowany był z chromosomem 2D i 2B, a homeologiczny chromosom 2A warunkował również wysoki przyrost kalusa co wskazuje, że grupa chromosomów 2 posiada genetyczne czynniki kontrolujące wzrost kalusa (25).

Wszystkie formy o chromosomach nie mających znaczenia, z wyjątkiem 5A, 5B i 4D, charakteryzowały się podobnym poziomem wzrostu tkanki kalusowej jak disomiczne kontrole. Formy, o chromosomach 6A, 3B, 5B, 5D i 6D, które są identyfikowane jako posiadające modyfikujące czynniki hamujące regenerację kalusa, wykazywały również niski współczynnik wzrostu kalusa. Ta zależność może wskazywać na plejotropowy charakter funkcjonowania genu. Chromosomy 2D i 2B wpływały na najwyższy współczynnik wzrostu kalusa. Substytucja chromosomu 2D z innej badanej odmiany przyczyniła się do znacznej utraty procentu zdolności regeneracyjnej w stosunku do innych testowanych chromosomów, co wskazuje na zaangażowanie grupy drugiej chromosomów w zespół cech określanych jako *Tissue Culture Response* (25).

Wpływ cytoplazmy badano w kulturach inicjowanych wyłożonymi na pożywkę niedojrzałymi zarodkami ośmiu linii heksaploidalnej pszenicy *Triticum aestivum* L, cv. „Chinese Spring” (CS) z podstawioną cytoplazmą kilku gatunków *Aegilops* i dwoma gatunkami *Triticum* o różnej ploidalności:

<i>Aegilops bicornis</i> (2n)		((<i>bicornis</i>) – CS)
<i>Aegilops umbellulata</i> (2n)		((<i>umbellulata</i>) – CS)
<i>Aegilops squarrosa</i> (2n)		((<i>squarrosa</i>) – CS)
<i>Aegilops uniaristata</i> (2n)	× „Chinese Spring”	((<i>uniaristata</i>) – CS)
<i>Aegilops ovata</i> (4n)		((<i>ovata</i>) – CS)
<i>Triticum timopheevi</i> (4n)		((<i>timopheevi</i>) – CS)
<i>Triticum Zhukovskiyi</i> (6n)		((<i>Zhukovskiyi</i>) – CS)

W kulturach tych wykazano, że podstawione cytoplazmy siedmiu spokrewnionych dzikich linii nie miały wpływu na cechę indukcji tkanki kalusowej tworzonej w ciemności. Badane linie były natomiast zróżnicowane pod względem współczynnika wzrostu tkanki kalusowej. Wobec światła tylko linia ((*Zhukovskiyi*) – CS)) tworzyła więcej tkanki, natomiast w ciemności zarówno linia ((*Zhukovskiyi*) – CS)) jak i linia ((*bicornis*) – CS)).

Wszystkie dodane cytoplazmy z wyjątkiem ((*umbellulata*) – CS)) miały znacząco stymulujący wpływ na tworzenie się zielonych centrów merystematycznych. Zaobserwowano również znaczną zmienność pomiędzy liniami w liczbie kalusów produkujących zielone centra na świetle. Najbardziej morfogeniczne były następujące linie kalusowe: ((*Zhukovskiyi*) – CS)), ((*squarrosa*) – CS)), ((*uniaristata*) – CS)), ((*bicornis*) – CS)). Jednakże, najwięcej zielonych pędów produkowały następujące dwie linie kalusowe: ((*squarrosa*) – CS)) i ((*bicornis*) – CS)). Dane te wskazują, że substytucja cytoplazmy może przyczynić się do polepszenia efektywności regeneracji dla tzw. „gatunków trudnych” poprzez wykorzystanie specyficznej jądro – cytoplazmatycznej interakcji (26).

Aby określić wpływ substytucji cytoplazm *Ae. ovata* i chromosomów 4B w doświadczeniach zastosowano 3 linie *Triticum aestivum* zawierające następujące substytucje chromosomu 4B (Capelle-Deprez) i cytoplazmy *Aegilops ovata*: Cappelle-Desprez (Cap), „Chinese Spring” (CS), ((CS (Cap 4B)), ((*ovata*) – CS)) i *ovata* – CS (Cap 4B) (tab. 2).

Tabela 2

Wpływ substytucji chromosomu 4B i cytoplazmy na reakcję tkanki kalusowej *Triticum aestivum* cv. „Chinese Spring” (CS)

Linia	Współczynnik wzrostu (mm)	Kalusy morfogenetyczne (%)		Kalusy zdolne do regeneracji (%)	
		pożywka inicjalna	pożywka utrzymująca	pożywka utrzymująca	pożywka regenerująca
CS	140,6	44,5	68,3	20,0	48,4
CS (Cap4B)	167,2	56,4	92,0	47,0	58,4
(<i>ovata</i>)	133,1	23,3	71,0	26,9	38,5
(<i>ovata</i>)- CS (Cap4B)	145,0	47,0	82,5	52,5	57,7

W przeprowadzonych eksperymentach nie stwierdzono różnic w formie i charakterze tworzącej się tkanki kalusowej na pożywce inicjalnej. Wzrost tkanki kalusowej znacząco wzrastał w obecności substytucji Cap 4B, natomiast istotnie malał w obecności cytoplazmy *Ae. ovata*.

Na tworzenie się pędów na pożywce inicjalnej miała wpływ cytoplazma *Ae. ovata* jak i chromosomy Cap 4B. Rozwój zawiązków pędu był istotnie ograniczony w liniach alloplazmatycznych, podczas gdy w liniach substytucyjnych chromosomów było znacznie więcej primordiów pędowych niż w liniach euploidalnych. W kulturach przedłużonych tylko substytucja chromosomowa miała duży wpływ na aktywność regeneracyjną. Proliferacja komórek, tworzenie primordiów i regeneracja roślin w tkance kalusowej w liniach z substytucją Cap 4B może być efektem funkcjonowania genów stymulujących wzrost, które znajdowały się na substytucyjnych chromosomach 4B Cappelle-Desprez lub też utratą genów hamujących chromosomów 4B „Chinese Spring” (27).

Podjęcie badań z grupą drugą chromosomów związane jest m.in. z rozlokowaniem w niej 10 genów karłowatości. Wiadomo, że geny te mają decydujący wpływ na wzrost i morfologię rośliny poprzez wpływ na metabolizm IAA i kwasów giberelinowych. Ponadto grupa druga chromosomów posiada homeoalleliczne loci dla fotoperiodyzmu, które wpływają na reakcję pszenicy na długość dnia. Możliwość allelicznej zmienności tych loci może sugerować, że genotypowa zmienność dla indukcji kalusa, jego utrzymywania oraz regeneracja roślin angażuje modyfikowanie metabolizmu hormonów. Obok tych fizjologicznych czynników wpływających na eks-

presję zdolności morfogenetycznych kultur nie bez znaczenia mają również warunki środowiskowe. Stosując pełną serię linii substytucyjnych dwóch pszenic „Chinese Spring”/„Cheyenne” wykazano poprzez porównanie materiału pochodzącego z pola i komórek hodowlanych, że chromosomy 7B, 1D, 7B wśród innych siedmiu miały znaczący wpływ na regenerację roślin (28). Linie ditelosomiczne i nullisomiczno-tetrasomiczne dla specyficznej grupy roślin mogą dostarczyć informacji na temat chromosomowej lokalizacji i genetycznej kontroli genów wpływających na wybraną cechę. W obecności jednolitego genotypu różnice wynikające z obecności lub braku poszczególnych ramion badanego chromosomu lub efekt dawki chromosomu, mogą posłużyć do określenia umiejscowienia genów odpowiedzialnych na przykład za zespół cech TCR (*Tissue Culture Response*) (25).

Stosując ditelosomiczne linie stwierdzono, że kalus pochodzący z formy CS dt – 2DL nie zawierający krótszego ramienia chromosomu 2D wykazuje reakcję regeneracyjną, a współczynnik jego wzrostu był równy lub lepszy w stosunku do formy euploidalnej „Chinese Spring”. Jeżeli jednak występuje brak ramienia dłuższego chromosomu 2D (CS dt – 2DS), wówczas obserwuje się wyraźną redukcję zdolności tkanki kalusowej do wzrostu i regeneracji. W badaniach tych wykazano również, że zestaw homologiczny loci czułych na warunki kultury *in vitro* znajdują się na następujących ramionach chromosomów 2AL, 2BS i 2DL u pszenicy „Chinese Spring”.

linie „Chinese Spring”

ditelosomiczne	nulli-tetrasomiczne
CS dt-2BL	CS n2A-t2B
CS dt-2DL	CS n2A-t2D
CS dt-2AS	CS n2B-t2A
CS dt-2DS	CS n2B-t2D
	CS n2D-t2A
	CS n2D-t2B

W analizie nullisomiczno-tetrasomicznej wykazano, że trzy homologiczne chromosomy zawierają geny kontrolujące TCR. Szczególnie dotyczy to chromosomu 2B. Wzrost dawki chromosomu 2A i 2D nie kompensuje braku 2B chromosomu. Chromosom 2B „Chinese Spring” posiada najprawdopodobniej główny gen regulatorowy TCR, ponieważ tetrasom 2B był zdolny do promowania normalnego wzrostu tkanki kalusowej i regeneracji wobec braku 2A, a w kulturze przedłużonej do 120 dni przy nieobecności 2D.

Na podstawie analizy form ditelo- i nulli-tetrasomicznych rozwinięto hipotetyczny model kontroli TCR przez grupę drugą chromosomów. Główny gen TCR zlokalizowany byłby na chromosomie 2DL, przy czym chromosomy 2AL oraz 2BS posiadają pomocnicze geny TCR. Prawdopodobnie główny gen regulatorowy znajdujący się na chromoso-

mie 2B kontroluje ekspresję TCR genów. Strata TCR w nieobecności 2B (n2B-t2A i n2B-t2D) i w mniejszym stopniu wobec nieobecności 2D (n2D-t2A i n2D-t2B) potwierdzają hipotezę ułożenia kontroli ekspresji TCR genomu na chromosomie B (29).

Stosując system serii nullisomiczno-tellosomicznych i ditellosomicznych wykazano możliwość kontroli utrzymania morfogenicznej tkanki kalusowej skutelum nie-dojrzałego zarodka pszenicy „Chinese Spring” w długotrwałych kulturach *in vitro*. W uzyskanych rezultatach wskazuje się na następujące zależności:

1) indukcja komórki somatycznej skutelum w kierunku somatycznej embriogenezy i uzyskanie zdolności embriogenicznych wymaga auksyny dla przeprogramowania ekspresji genów. Główna kontrola tego procesu jest ulokowana na następujących ramionach chromosomów 1AL, 3AL, 3BL i 3DL. Kolejno, brak tych ramion powoduje redukcję indukcji zarodków somatycznych, zielonych centrów i ogranicza regenerację roślin;

2) kolejny etap rozwoju dotyczy różnicowania komórek embriogenicznych w zarodek i zielone centra merystematyczne. W ten proces zaangażowanych było bardzo wiele genów rozmieszczonych na wszystkich ramionach chromosomów genomu. Jednakże negatywny efekt na proces różnicowania posiadały ramiona 1DL i 1DS. Ich brak poprawiał formowanie somatycznych zarodków. Ramię 4AS było związane tylko z tworzeniem zarodków, kiedy ramię 2AS tylko z formowaniem zielonych centrów. Kielkowanie zarodków było kontrolowane tylko przez trzy ramiona chromosomów 1AS, 2AL i 2BL;

3) w kulturze krótkoterminowej ramiona 2DL i 2BS przyczyniają się zarówno do tworzenia zarodków jak i utrzymania regeneracji. Brak ramienia 4BS powoduje wzrost tworzenia zarodków somatycznych w tej kulturze, a z brakiem ramienia 4BL związane jest obniżenie tej zdolności. Nieobecność ramion 6DS i 7BS powoduje ograniczenie frekwencji występowania zarodków, natomiast podwyższa poziom tworzenia zielonych centrów regeneracyjnych, a ramiona 2AL i 2BL zdolność do krótkotrwałej regeneracji;

4) w długoterminowej kulturze brak ramion 4BS, 5BS, 7DS podnosił częstotliwość regeneracji, a utrzymanie embriogeniczności wymagało ramion 1BS i 2DS (30).

W artykule przedstawione zostały problemy dotyczące możliwości wykreowania takiej syntetycznej formy pszenicy, która spełniałaby warunki wysokich zdolności morfogenetycznych zarówno poziomu diploidalnego jak i haploidalnego. Taka syntetyczna pszenica bez wątplenia mogłaby mieć wszechstronne zastosowanie w wprowadzaniu nowych form o zmodyfikowanym genomie na drodze klasycznego krzyżowania i selekcji oraz na drodze transformacji.

Literatura

1. Vasil V., Redway F., Vasil I. K., (1990), *Bio/Technology*, 8, 429-434.
2. Amed K. Z., Sagi F., (1993), *Plant Cell Reports*, 12, 175-179.
3. Yang Y. M., He D. G., Scott K. J. J., (1994), *Plant Cell Reports*, 13, 176-179.

4. Chowdhury M. K. U., Vasil V., Vasil I. K., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 821-828.
5. Zhang L., Rybczyński J. J., Langenberg W. G., Mitra A., French R., (2000), *Plant Cell Reports*, 19 (3), 241-250.
6. Morsan P. A., Luppotto E., Locatelli F., Qiao Y-M., Cattaneo M., (1993), *Plant Science*, 93, 85-94.
7. He D. G., Mouradov A., Yang Y. M., Mouradova E., Scott K. J., (1994), *Plant Cell Reports*, 14, 192-196.
8. Perl A., Kless H., Blumenthal A., Galili G., Galun E., (1992), *Molecular & General Genetic*, 235, 279-284.
9. Vasil V., Srivastava V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K., (1993), *Bio/Technology*, 11, 1553-1558.
10. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stöger E., Vasil I. K., (1996), *Plant Cell Reports*, 16, 12-17.
11. Weeks J. T., Anderson O. D., Blechl A. E., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 1077-1084.
12. Srivastava V., Vasil V., Vasil I. K., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1031-1037.
13. Rybczyński J. J., Simonson R. I., Baenziger P. S., (1991), *In vitro Cell Dev. Biol.*, 27P, 168-174.
14. Gustafson V. D., Baenziger P. S., Wright M. S., Stroup W. W., Yen Y., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 207-213.
15. Karsai I., Bedo Z., Hayes P. M., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 49-53.
16. Zhou H., Zheng Y., Konzak C. F., (1991), *Plant Cell Reports*, 10, 63-66.
17. Jones A.M., Petolino J.F., (1987), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 215-223.
18. Zhou H., Konzak C. F., (1992), *Genom*, 35, 957-961.
19. Lazar M. D., Chen T. H. N., Scoles G. J., Kartha K. K., (1987), *Plant Science*, 51, 77-81.
20. Hasam S. L. K., Zeller F. J., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 951-954.
21. Tsunewaki K., Mukai Y., (1990), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Ed. Bajaj Y. P. S., vol. 13. *Wheat*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 460-478.
22. Agache S., Bachelier B., de Buyser J., Henry Y., Snape J., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 77, 7-11.
23. Henry Y., de Buyser J., (1985), *Plant Cell Reports*, 4, 307-310.
24. Ghaemi M., Sarrafi A., (1994), *Plant Breeding*, 112, 76-79.
25. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 625-632.
26. Mathias R. J., Fukui K., Law C. N., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 70-75.
27. Mathias R. J., Fukui K., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 71, 797-800.
28. Galiba G., Kovacs G., Sutka J., (1986), *Plant Breeding*, 97, 261-263.
29. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783-787.
30. Henry Y., Marcotte J.-L., de Buyser J., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 344-354.