



Kultura *in vitro* i biotechnologia – spełnione nadzieje?

Stefan Malepszy, Wojciech Burza

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

In vitro culture and biotechnology – fulfilled expectations?

Summary

The methods for *in vitro* culture of plant cells, tissues and organs had focused much attention in the beginning of the last century, which resulted in setting up the first commercial laboratories over 60 years ago. These laboratories concentrated their activity on clonal propagation and their economical importance has been permanently growing. However, some of the applications of *in vitro* methods are still not realistic, whereas introduction of other is not satisfactory. Plant breeding is an example where application of tissue culture techniques is below expectations. There are several reasons for such situation. Two of them are of biological nature (genotypic effect, somaclonal variation), and the third reason results from the development of other molecular methods providing alternative solutions. We suggest that the main limitations in more effective usage of *in vitro* methods should be minimized by the development of efficient plant stem cells' culture procedures.

Adres do korespondencji

Stefan Malepszy,
Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa
i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 166,
02-776 Warszawa;
e-mail:
stefan_malepszy@sggw.pl

Key words:

micropropagation, somaclonal variation, genotypic effect, plant stem cell.

1. Wprowadzenie

Minęło niedawno 100 lat od pokazania, że komórki roślinne można uprawiać aseptycznie w warunkach sztucznych, co nazwano metodą kultury *in vitro*. Już wtedy kultura *in vitro* pobudzała wyobraźnię zarówno w sferze badań poznawczych, jak i praktycznych. Zaowocowało to, jeszcze w latach trzydziestych ubiegłego wieku, próbami opatentowania tej metody w USA.

Jednak w efekcie powstało wiele patentów szczegółowych, związanych ze specyfiką biologiczną poszczególnych grup roślin, opracowano specjalne rozwiązania techniczne oraz określone zabiegi zwane także procedurami. Najważniejszym było jednak powstanie komercyjnych laboratoriów klonowania roślin (mikrorozmnażania), które od sześćdziesięciu lat są ważną częścią gospodarki wielu krajów nazywaną przemysłem *in vitro*. Przemysł ten nieustannie rozwija się, wprowadzając wiele udoskonaleń możliwych dzięki rozwojowi nauki i techniki, chociaż korzystanie z patentów jest coraz rzadsze. Natomiast od strony biologicznej jedno pozostaje niezmiennione, mianowicie do klonowania wykorzystywane są przede wszystkim struktury zorganizowane – jak protokormy u storczyków i pąki boczne oraz ich odpowiedniki u innych gatunków. Początkowo przemysł *in vitro* zajmował się wyłącznie roślinami ogrodniczymi, ale wprowadzane są nowe gatunki o innym aniżeli rośliny ogrodnicze przeznaczeniu. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku przemysł ten pojawił się także w leśnictwie i rolnictwie oraz wręcz zawładnął miskantem oferowanym do produkcji energii odnawialnej. W uprawie ziemniaka zaczęto wprowadzać technologię klonowania polegającą na indukowaniu organów spichrzowych nazwanych mikrobulwkami. Przemysł *in vitro* zaczął także poszukiwać bardziej kompleksowych rozwiązań. Wyrazem tego jest rozszerzenie działalności o hodowlę odmian własnych (głównie w roślinach ozdobnych), które ma skutkować zwiększeniem konkurencyjności na rynku. Przemysł *in vitro* jest ważną sferą gospodarki w wielu krajach (1), jednak nie wszystkie scenariusze jego rozwoju udało się zrealizować. Do tych ostatnich należy na przykład robotyzacja i automatyzacja klonowania oraz sztuczne nasiona. Sztuczne nasiona w pierwotnym zamyśle bazowały na embriogenicznych kulturach komórkowych i pożywkach płynnych. Chociaż technologia ta została zastosowana u kilku gatunków, to jednak jest to głównie wynik rozszerzenia pierwotnej definicji, a nie efektów wypływających z wykorzystania kultur zawieszonych.

Innym, obok mikropropagacji, ważnym obszarem gospodarczego wykorzystania kultury *in vitro* jest produkcja określonych substancji, przede wszystkim biologicznie czynnych i potrzebnych głównie w przemyśle farmaceutycznym i przemysłach pokrewnych (np. kosmetyczny) oraz w przemyśle dodatków do żywności. Jednakże w tym zakresie przykładów komercyjnego wykorzystania jest niewiele, pomimo intensywnych badań i sporych oczekiwań (21).

Kolejnym bardzo ważnym obszarem gospodarczego wykorzystania kultur *in vitro* jest hodowla roślin. Oczekiwania dotyczące tego obszaru były inspirowane spektakularnymi (w sensie metodycznym) osiągnięciami lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Należały do nich m.in. uzyskanie mieszańca somatycznego ziemniaka z pomidorem (słynne pomato i topato), fuzje komórek człowieka i protoplastów tytoniu, fuzje protoplastów izolowanych z gamet oraz wiele innych. Perspektywy jakie tutaj nakreślano były niejednokrotnie fascynujące i chociaż pojedyncze sukcesy miały miejsce (22), to jednak zakres i efekty wprowadzonych rozwiązań (nade wszystko w sensie powszechności stosowania), na pewno nie są w pełni satysfakcjonujące.

Wydawało się, że kultura *in vitro* pozwoli pokonać wiele ograniczeń występujących w hodowli nowych odmian. Oczekiwano m.in. zastosowania hybrydyzacji do przenoszenia genów między gatunkami oraz uzyskiwania mieszańców pełnych (nowe gatunki uprawne); szybkiej homozygotyzacji z wykorzystaniem podwojonych haploidów; „podstawiania” cytoplazmy przy tworzeniu komponentów męsko-sterylnych do produkcji odmian heterozyjnych; uzyskiwania ściśle określonych kombinacji genotypowych przez fuzje protoplastów w ziemniakach dihaploidalnych. Dużych ułatwień oczekiwano z zastosowania selekcji określonych mutantów (7).

Jeśli dokładnie przyjrzeć się przyczynom niespełnienia wielu oczekiwań, szczególnie w hodowli roślin, to można je ująć w trzy kategorie. Jedne mają charakter biologiczny, drugie są wynikiem pojawienia się nowych możliwości (przede wszystkim powstałych dzięki rozwojowi biologii molekularnej), a trzecie są spowodowane zbyt dużymi kosztami poszczególnych rozwiązań. Na przykład inżynieria genetyczna dość radykalnie zmniejszyła znaczenie hybrydyzacji i selekcji mutantów jako źródeł nowych cech.

Spośród wymienionych kategorii ograniczeń chcielibyśmy skupić się na przyczynach biologicznych. Są one pochodną dwóch problemów o charakterze podstawowym związanych z samą kulturą. Pierwszym jest efekt genotypu w kulturze – przede wszystkim wydajność regeneracji i jakość roślin zregenerowanych, natomiast drugim jest powszechność występowania zmienności somaklonalnej. Obydwa te zjawiska występują ze szczególnym nasileniem w przypadku sytuacji w których regeneracja jest związana z odróżnicowaniem. Sądzimy, że szczegóły podane w dalszej części tego artykułu uzasadnią ten punkt widzenia oraz pokażą czy realne jest pokonanie obu wspomnianych ograniczeń.

2. Efekt genotypu w kulturze

Zgodnie z teorią totipotencji każda komórka żywa jest potencjalnie zdolna do odtworzenia (regeneracji) organizmu, jednak ujawnienie tej zdolności jest możliwe w określonym środowisku, nazywanym warunkami kultury. Owe warunki kultury nie są uniwersalne, lecz wykazują specyficzność przejawiającą się w ten sposób, że będąc odpowiednimi dla jednego gatunku, po zastosowaniu do innego mogą zupełnie zawodzić. Wpływ genotypu jest szczególnie silny w tych przypadkach kiedy regeneracja jest związana ze zmianą pierwotnej determinacji rozwojowej, czyli koniecznością odróżnicowania komórek eksplantatu pierwotnego. Różnice w wymaganiach co do warunków kultury dotyczą nie tylko gatunków, ale występują także wewnątrz gatunku, czyli między odmianami (liniami) i formami. Skutkiem tego jest konieczność tworzenia lub przynajmniej testowania procedur dla poszczególnych obiektów. W praktyce jest to duże utrudnienie, tym bardziej dotkliwe, że często nie można łatwo określić czynnika(ów), które za tą zmienność reakcji odpowiadają. Sytuację tę jeszcze komplikuje występowanie różnic w reakcji, zależnie od typu kultury. In-

nymi słowy odmiana/linia regenerująca rośliny w kulturze kalusa otrzymanego z liści, może nie regenerować roślin w kulturze protoplastów mezofilowych i/lub w kulturze pylników czy mikrospor. Przykłady takich zależności pomiędzy typem kultury a totipotencją wyrażoną zdolnością do regeneracji roślin pokazano w tabeli 1. Uważa się, że za występowanie efektu genotypu są odpowiedzialne różnorodne mechanizmy genetyczne, od najprostszych wynikających z działania pojedynczych genów, po bardziej złożone jak różne typy współdziałania i QTL (17). W ten sposób zjawisko to jest bardzo skomplikowane (genotyp+typ kultury+różne geny dla różnych typów kultury). Znane są wprawdzie sugestywne przypadki wykorzystania wiedzy o genetycznym uwarunkowaniu regeneracji, jednak mają one charakter incydentalny. Rozwiązaniem byłoby monitorowanie czynników genetycznych wpływających na efekt kultury w procesie hodowli. Nie jest to możliwe ze względu na koszty z tym związane.

Tabela 1

Zróżnicowana zdolność do regeneracji obserwowana wśród linii wsobnych żyta w zależności od typu kultury *in vitro* (14-16)

Linia	Typ kultury i udział (%) eksplantatów regenerujących rośliny		
	niedojrzałe zarodki	niedojrzałe kwiatostany	pylniki
L318	60,2	60,1	0,44
L9	0,0	0,0	0,0
H363	0,0	76,4	nb
D855	19,9	53,9	nb
L299	1,4	0,0	nb
H316	29,1	0,0	nb
Dw28	nb	48,0	0,0

nb – nie badano

Wpływ genotypu może powodować dodatkowe konsekwencje w przypadku kultury pylników i kultury mikrospor. Otóż ten typ kultury jest stosowany w celu zastąpienia segregacji zygotycznej, segregacją gametyczną, co skutkuje skróceniem czasu potrzebnego na otrzymanie linii homozygotycznych oraz wielokrotnym zmniejszeniem liczebności analizowanych roślin, a w efekcie końcowym prowadzi do obniżenia kosztów wytwarzania nowych odmian. Otóż w każdej z dwóch podstawowych metod używanych w tym celu, to jest metody androgenezy oraz gynogenezy występuje silna zależność od genotypu dawcy. Tymczasem nie znamy powiązań jakie występują między genami sprzyjającymi powstawaniu haploidów a cechami ważnymi z punktu widzenia hodowlanego. Bez wyjaśnienia tych zależności używanie podwojonych haploidów może ograniczać efektywność hodowli, szczególnie kiedy jest stosowane jako metoda podstawowa i/lub jest używane na dużą skalę.

Wpływ genotypu na regenerację roślin ma także swoje konsekwencje ujemne w przypadku stosowania modyfikacji genetycznych. Utrudnia bowiem realizację optymalnego scenariusza tworzenia odmiany genetycznie zmodyfikowanej, zgodnie z którym biorcą transgenu powinna być określona odmiana, najlepiej bardzo dobra, znajdująca się na rynku (18,19). Natomiast jeżeli dana odmiana w kulturze nie regeneruje lub regeneruje słabo, wtedy potrzebne są inne rozwiązania, utrudniające realizację scenariusza optymalnego. Konsekwencją będą zwiększone koszty.

3. Zmienność somaklonalna

Rośliny powstałe w kulturze *in vitro* z eksplantatów zawierających komórki somatyczne są klonem rośliny, która była dawcą eksplantatu, a zatem fenotypowo powinny być identyczne z dawcą. Jest to w zasadzie prawdziwe w odniesieniu do kultury merystemów pędowych oraz kultur z nią ekwiwalentnych, ale głęboko nieprawdziwe w tych przypadkach, kiedy do regeneracji roślin niezbędne jest odróżnicowanie komórek eksplantatu pierwotnego. Znalazło to swój wyraz we wprowadzeniu terminu zmienność somaklonalna (8). Zakłada się, że regeneracja związana z odróżnicowaniem, wywołuje głębokie zmiany w epigenomie (20), a samej kulturze przypisuje się wręcz działanie mutagenne (5). Uważa się jednak, że poszczególne typy kultury różnią się znacznie pod względem częstotliwości wywoływania zmian somaklonalnych, aczkolwiek dane eksperymentalne o tych relacjach są bardzo niepełne (6). Przyczyną takiego stanu jest metodyczna trudność udowodnienia takiego zróżnicowania. Są zatem takie typy kultury, w których częstotliwość zmian somaklonalnych jest wysoka i takie gdzie jest ona minimalna. Przykład takich zależności pomiędzy sześcioma typami kultury *in vitro* a częstotliwością zmian somaklonalnych, mierzoną frekwencją występowania dziedzicznych zmian morfologicznych, podano w tabeli 2 dla ogórka. Przywołujemy te dane, ponieważ we wszystkich przypadkach posłużono się jednakową miarą, którą była częstotliwość występowania nowych fenotypów w pierwszym pokoleniu po samozapyleniu tej samej wysoce wsobnej linii, co było zasadnicze dla prawidłowego wnioskowania. Wskazują one, że w niektórych typach kultury zmienność jest bardzo silna i potomstwa wolne od zmian są nieliczne, na przykład kultura protoplastów ogórka. Są jednak i takie gdzie frekwencja zmian jest minimalna lub występują tylko zmiany spowodowane mutacjami w DNA mitochondrialnym. Zależności takie występują prawdopodobnie u większości gatunków, czyli są typy kultury działające bardziej mutagennie i takie w których efekt ten jest niewielki. Zmiany spowodowane mutacjami w DNA mitochondrialnym nie powinny być problemem w komercyjnym wykorzystaniu klonowania, albowiem nie przeprowadza się samozapyleń, koniecznych do pełnego ujawnienia cech genotypowych (homoplastyzacji). W tabeli 3 podano z kolei występowanie roślin tetraploidalnych w trzech typach kultury. Także w tym przypadku występują dwie zależności – są typy kultury nie generujące tetraploidalnych regeneratów oraz typy w których

wystąpienie takich zdarzeń jest nieregularne i zależy od eksperymentu. Zmienność somaklonalna nie jest niestety jedyną zmiennością występującą po kulturze *in vitro*, albowiem w przypadku kultury pylników i mikrospor pojawia się zmienność gametoklonalna, która może dodatkowo utrudniać uzyskiwanie określonych kombinacji genetycznych linii DH (podwojonych haploidów).

Tabela 2

Zależności pomiędzy typem kultury *in vitro* i zmiennością somaklonalną wyrażoną częstotliwością potomstw R1 segregujących nowe cechy morfologiczne u ogórka linii B

Typ kultury	Ogólna liczba potomstw	Potomstwa segregujące (%)
kontrola (z nasion)	60	0
merystemy	31	6,7*
regeneracja z kalusa	60	8,3
bezpośrednia regeneracja z mikroeksplantatów liściowych (2)	67	11,9*
bezpośrednia regeneracja z protoplastów	20	90

* Wszystkie potomstwa o fenotypie MSC (4,10), fenotyp ten jest spowodowany przez mitochondria, na roślinie R0 pojawia się najczęściej w postaci plamek na jednym lub kilku liściach i po kolejnych samozapyleniach i selekcji obejmuje całą roślinę.

Tabela 3

Zmienność somaklonalna wyrażona występowaniem tetraploidów w pokoleniu R0 po czterech typach kultury u ogórka linii B; I, II – oznacza niezależne eksperymenty

Typ kultury	Liczba roślin analizowanych	Tetraploidy (%)
merystemy	31	0
kalus z roślin		
I	60	0
II	25	12
protoplasty z embriogenicznej kultury zawieszinowej		
I	20	0
II	15	26,6
bezpośrednia regeneracja z mikroskrawków liściowych		
I	67	0
II	21	0

Zmienność somaklonalna jest także niepożądana podczas uzyskiwania odmian genetycznie zmodyfikowanych. Powoduje bowiem, że po transformacji pojawiają się rośliny o cechach nowych, ale nie będących skutkiem działania transgeny. Prowadzi to do zwiększenia efektów niezamierzonych, których częstotliwość może być duża i może

bardzo silnie zależeć od odmiany (19). Może to powodować różnorakie ograniczenia, zwykle zmniejsza efektywność hodowli transgenicznej i zwiększa jej koszty.

4. Czy efekt genotypu i zmienność somaklonalna są nieuniknione?

Z przedstawionych danych wynika, że obydwa zjawiska – efekt genotypu i zmienność somaklonalna ograniczają wykorzystanie niektórych możliwości aplikacyjnych kultury *in vitro*. Czy można temu zaradzić? Otóż, jak się wydaje, szanse uwolnienia się od obu tych ograniczeń, przynajmniej w pewnym zakresie, powstają w przypadku dysponowania kulturą komórek macierzystych. Występowanie takich komórek w roślinach jest dobrze udokumentowane (9,11) i można oczekiwać, że brak zmienności somaklonalnej powinien wynikać z dwóch podstawowych właściwości tych komórek. Są to zdolność do realizacji pełnego programu rozwojowego bez konieczności odróżnicowania oraz suwerenność rozwojowa umożliwiającą rezygnację ze stosowania hormonów egzogennych w celu regeneracji roślin. Hormony są bowiem uznawane za jeden z podstawowych czynników zmienności somaklonalnej. Wykorzystanie komórek macierzystych powinno także eliminować lub przynajmniej znacząco ograniczać efekt genotypu ze względu na wspólność mechanizmów rozwojowych w obrębie poszczególnych grup systematycznych. Problem jednak w tym, że do tej pory nie wiemy czy komórki macierzyste roślin można utrzymywać w układzie eksperymentalnym *in vitro*. Otóż wydaje się, że opisana przez W. Burzę (tab. 4) embriogeniczna kultura zawieszona ogórka, wykazująca zieloną autofluorescencję ma wiele nieoczekiwanych zalet w porównaniu z typową (klasyczną) kulturą zawieszoną, a niektóre jej cechy nawiązują bezpośrednio do właściwości komórek macierzystych. Są nimi w szczególności: długotrwanie utrzymujący się potencjał regeneracyjny, stabilność genetyczna w zakresie ploidalności, suwerenność wzrostowa i rozwojowa przejawiająca się zdolnością do proliferacji oraz regeneracji roślin bez egzogennej stymulacji hormonalnej oraz niezwykła żywotność, w tym zdolność do wzrostu w ekstremalnie niskim zagęszczeniu.

Tabela 4

Porównanie podstawowych właściwości typowej kultury zawieszinowej ogórka (proliferyjącej na pożywce z 2,4-D) z właściwościami kultury zawieszinowej wykazującej zieloną autofluorescencję (3,4,12,13; Burza nie publikowane). W tej ostatniej, jak się wydaje, występują niektóre cechy komórek macierzystych

Właściwość	Kultura zawieszinowa klasyczna	Kultura zawieszinowa z autofluorescencją
1	2	3
zachowanie zdolności do regeneracji	6-18 miesięcy	ponad 48 miesięcy
stabilność genetyczna regenerantów	diploidy, w miarę upływu czasu kultury wzrost udziału $4n$	diploidy
stymulacja regeneracji roślin	eliminacja z pożywki 2,4-D lub zastąpienie auksyny cytokininą	sterowanie proliferacją i regeneracją bez egzogennych regulatorów wzrostu

1	2	3
minimalne zagęszczenie komórek do utrzymania proliferacji	100 000 w 1 cm ³	1 komórka/cm ³
jakość pożywki proliferacyjnej	bogata – ½ związków mineralnych MS* i hormony	uboga – ½ substancji mineralnych MS, z substancji organicznych tylko sacharoza, bez hormonów
wpływ genotypu na regenerację	silny, regeneracja tylko u niektórych odmian/linii	bez znaczenia, regeneracja także u genotypów znanych jako „recalcitrant <i>in vitro</i> ”
częstość pasażowania	7-14 dni	żywołność nawet po 18. miesiącach bez pasażowania

*MS – pożywka wg Murshige i Skoog (1962).

Literatura

- Bach A., Pawłowska B., (2009), *Procesy rozwojowe w kulturze in vitro i typy kultury*, 21-40, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa,.
- Burza W., Malepszy S., (1995), *Plant Breeding*, 114, 341-345.
- Burza W., Malepszy S., (1998), *Cytokinin control cucumber (Cucumis sativus L.) somatic embryogenesis*, IX International Congress on Plant Tissue and Organ Culture, Jerusalem, June 14-19, 68.
- Burza W., Zuzga S., Yin Z., Maleszy S., (2006), *Cucumber (Cucumis sativus L.)*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol. 343, *Agrobacterium Protocols*, 2/e, edited by Kan Wang, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 427-438.
- Kaeppler S. M., Phillips R. L., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8773-8776.
- Karp A., (1991), *On the current understanding of the somaclonal variation*, Ed. Mifflin, Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, vol 7, 1-58, Oxford Univesity Press.
- Karp A., (1995), *Euphytica*, 85, 295-302.
- Larquin P. J., Scowcroft W. R., (1981), *Theor. Appl. Genetics*, 60, 174-212.
- Laux T., (2003), *Cell*, 113, 281-283.
- Lilly J. W., Bartoszewski G., Malepszy S., Havey M. J., (2001), *Curr. Genetics*, 40, 144-151.
- Majewska-Sawka A., (2009), *Struktura i właściwości komórek roślinnych*, 12-20, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Malepszy S., Burza W., (2007), Sposób klonalnego rozmnażania roślin. Patent nr 197 338.
- Malepszy S., Burza W., (2007), Sposób wytwarzania ryboflawiny w płynnej kulturze embriogenicznej roślin, Patent nr 200 881.
- Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 406-410.
- Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1995), *Euphytica*, 83, 233-239.
- Rakoczy-Trojanowska M., Śmiech M., Malepszy S., (1997), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 48, 15-21.
- Rakoczy-Trojanowska M., (2009), *Czynniki genetyczne dawcy – złożoność i monitorowanie*, 44-53, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Malepszy S., (2008), *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 1, 10-14.
- Malepszy S., Orlikowska T., (2009), *Hodowla odmian transgenicznych*, 456-466, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- McClintock B., (1984), *Science*, 226, 793-801.
- Oleszek W., (2009), *Substancje bioaktywne roślin i ich biosynteza w kulturach in vitro*, 122-171, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Orczyk W., (2009), *Otrzymywanie i znaczenie mieszańców somatycznych*, 101-121, w: *Biotechnologia roślin* (redakcja naukowa S. Malepszy), Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.