



Niestabilność poziomu ploidalności podczas regeneracji transformowanego i nietransformowanego tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.)

Elwira Śliwińska¹, Jarosław Zimny¹, Lucyna Drozdowska²

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ²Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

Instability of ploidy level during regeneration of transformed and non-transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Summary

In plant tissue cultures, somaclonal variation is often observed. It can be an effect of the changes in the individual chromosome number or in the ploidy level. Flow cytometry, a fast and accurate method for the estimation of the nuclear DNA content, can be applied to study these changes. The DNA content in differentiated tissues of *Nicotiana tabacum* cultured *in vitro* was estimated using Partec CCA flow cytometer, starting from explant, through callus, up to regenerated shoots. The explant constituted stem segments of *N. tabacum* plants, non-transformed and transformed with *gfp* gene. Flow cytometric analysis showed differences in the proportion of 2C, 4C, 8C and 16C cells in plant tissue in different culture stages. Among the regenerated plantlets originated from non-transformed and transformed plants, diploid, tetraploid and mixoploid forms were observed. The transformation did not influence the share of cells representing different ploidy levels in the investigated plant material.

Adres do korespondencji

Elwira Śliwińska,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Akademia
Techniczno-Rolnicza,
ul. Kaliskiego 7,
85-789 Bydgoszcz;
e-mail:
elwira@atr.bydgoszcz.pl

Key words:

ploidy, flow cytometry, somaclonal variation, callus, plant regeneration, transformation.

1. Wstęp

Od czasu opublikowania przez Murashige i Skooga w 1962 r. składu uniwersalnej pożywki, umożliwiającej kulturę *in vitro* różnych organów, tkanek i komórek roślinnych (1), kultury tkankowe

zaczęły się intensywnie rozwijać i obecnie stanowią popularną technikę stosowaną nie tylko do celów badawczych, ale także hodowlanych, a nawet do produkcji sadzonek na skalę wielkotowarową. Stwierdzono jednakże, że wśród roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* może pojawiać się zmienność somaklonalna, związana z wielkością genomu. Zmienność ta może wynikać ze zmian strukturalnych i liczbowych pojedynczych chromosomów lub poziomu ploidalności (2-4). Ryzyko zachwiania stabilności genetycznej wzrasta wraz z trwaniem długości kultury *in vitro* (2). Stwierdzono także, że w eksplantatach stosowanych w kulturach tkankowych, takich jak hipokotyle czy liścienie, występuje zazwyczaj polisomatyczność (obecność komórek o różnej ploidalności) i merystemy, z których regenerują rośliny, mogą tworzyć się z komórek różniących się zawartością DNA. Może to prowadzić do regeneracji najczęściej niepożądanych roślin poliploidalnych lub miksoploidalnych (5,6). Kontrola cytologiczna jest zatem wskazana na wszystkich etapach prowadzenia kultur tkankowych, ze szczególnym uwzględnieniem końcowych produktów, takich jak mikrosadzonki, (dwu)haploidy czy też mieszańce somatyczne.

Cytometria przepływowa (FCM, *flow cytometry*) jest szybką i bardzo dokładną metodą oznaczania zawartości jądrowego DNA w dowolnych tkankach roślinnych (7). Może ona zatem być przydatna do analizowania zmian ilościowych DNA podczas prowadzenia kultur *in vitro* (5,8-13). Rośliny otrzymywane w kulturach tkankowych, szczególnie te zregenerowane z kalusa, często różnią się ploidalnością od roślin wyjściowych, jakkolwiek przeważnie obserwuje się indukowanie somatycznej embriogenezy z komórek zawierających 2C DNA (C – ilość DNA w haploidalnym genomie).

Celem przeprowadzonych badań była analiza zawartości jądrowego DNA w komórkach tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) na różnych etapach kultury *in vitro*, poczynając od eksplantatu, poprzez kalus, do zregenerowanych roślin. Aby stwierdzić, czy proces transformacji genetycznej ma specyficzny wpływ na zmiany ploidalności komórek w czasie trwania kultur *in vitro* określono proporcje jąder o różnej zawartości DNA (2C, 4C, 8C i 16C) w zróżnicowanym materiale roślinnym, otrzymanym z roślin nietransformowanych i transformowanych genem *gfp*. Porównano także ploidalność roślin wyjściowych i regenerantów.

2. Materiał i metoda

2.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) odmiany Bur-san (amfidiploid), nietransformowane i transformowane genem *gfp* (14). Nasiona wysiewano w szklarni do kuwet z mieszaniną torfu i piasku w proporcji 1:1. Po osiągnięciu fazy rozety, rośliny przesadzano na parapet, gdzie rosły do wysokości około

0,5 m (grubość łodygi 1,5 cm). Źródłem eksplantatów były fragmenty łodyg 6 nie-transformowanych i 6 transformowanych roślin.

2.2. Kultury *in vitro*

Fragmenty łodyg tytoniu sterylizowano powierzchniowo w 70% alkoholu etylowym. Po sterylizacji łodygi cięto poprzecznie na segmenty o grubości około 0,5 cm, z których izolowano miękisz rdzeniowy o powierzchni około 0,5 cm². Tak przygotowane eksplantaty wykładano do probówek z pożywką Murashige i Skooga (MS; 1) zawierającą kinetynę (0,2 mg/l) i kwas indolilo-3-octowy (IAA; 2 mg/l). Po czterech tygodniach wytworzony jednorodny, twardy, biały kalus pasażowano na pożywkę MS o tym samym składzie, lecz z obniżonym do 0,03 mg/l poziomem kinetyny w celu pobudzenia tworzenia kalusa luźnego, który charakteryzuje się wyższą zdolnością do organogenezy. Kalus luźny przenoszono następnie na pożywkę regeneracyjną (kinetyna 1 mg/l, IAA 0,03 mg/l). Kultury utrzymywano w fitotronie w temperaturze 23°C. Inicjacja kalusa zachodziła w ciemności, regeneracja pędów w warunkach 16 h fotoperiodu (16 h światło/8 h ciemność) przy natężeniu światła 2800 lx.

2.3. Cytometria przepływowa

Badaniom cytometrycznym poddane zostały fragmenty miękiszu rdzeniowego pobrane z części łodyg przylegających do wykładanych na pożywkę eksplantatów (po 2 z każdej rośliny), kalus w trakcie pasażu (twardy i luźny) i najmłodsze liście zregenerowanych roślin (wszystkich, które otrzymano; tab.). Standardem zewnętrznym były każdorazowo młode liście ukorzenionych roślin tytoniu rosnących w kulturach *in vitro*. Próby zostały przygotowane zgodnie z procedurą opracowaną przez Galbraitha i in. (15), z niewielkimi modyfikacjami. Materiał roślinny (ok. 1 cm³ tkanki) rozdrabniano żyletką na płytce Petriego, w obecności 1 ml buforu lizującego (0,1 M Tris, 2,5 mM MgCl₂·6H₂O, 85 mM NaCl, 0,1% Triton X-100; pH 7,0), zawierającego barwnik fluorescencyjny indolo-4',6-dwuamidyno-2-fenylodynę (DAPI; 2 µg/ml). Następnie zawiesinę filtrowano przez siatkę nylonową o średnicy oczek 50 µm, a otrzymany przesącz poddawano analizie przy użyciu cytometru przepływowego Partec CCA (Münster, Niemcy). W każdej próbie analizowano względną zawartość DNA w około 10 000 wyizolowanych jąder. Do wszystkich pomiarów zastosowano skalę logarymiczną, a histogramy analizowano za pomocą programu komputerowego Partec DPAC V2.1. W każdej próbie obliczono procentowy udział jąder o określonej zawartości DNA.

3. Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych pomiarach cytometrycznych przeprowadzonych w tkankach tytoniu z kultur *in vitro* wykazano w nich obecność jąder o zawartości 2C, 4C, 8C i 16C. Udział jąder o poszczególnych poziomach ploidalności był różny w zależności od analizowanej tkanki (tab., rys.). W eksplantatach, pochodzących zarówno z roślin nietransformowanych jak i transformowanych, ponad połowa wszystkich komórek wykazywała zawartość 4C DNA, jakkolwiek obserwowano także znaczący udział komórek 2C. Jedynie niewielki procent stanowiły komórki zawierające 8C DNA. Na eksplantacie tworzył się kalus twardy, w którym znacznie zmniejszył się lub nawet zanikł udział komórek 2C, natomiast wzrósł udział komórek o wyższej ploidalności. Przyczyną tego zjawiska była najprawdopodobniej zawartość regulatorów wzrostu w pożywce. Wcześniej stwierdzono, że regulatory wzrostu, szczególnie auksyny, wpływają na mitozę w czasie proliferacji kalusa lub regeneracji pędów i tym samym stymulują tworzenie poliploidalnych komórek (16-18). Miksoploidalność kalusa, podobną do stwierdzonej w naszych badaniach, obserwowano wcześniej u ogórka (11) i buraka cukrowego (12). Otrzymane w przeprowadzonych obecnie doświadczeniach kalusy twarde można było podzielić na dwie grupy: pierwszą z przewagą komórek 4C (typ 4C) i drugą, w której dominowały komórki 8C (typ 8C). Z tego drugiego, po przeniesieniu na pożywkę regeneracyjną, najczęściej nie rozwijał się kalus luźny. Na tym etapie kultury obserwowano także obecność komórek zawierających 16C DNA, a ich udział w kalusie typu 8C przekraczał 5% (tab.). Kalus luźny, powstały po pasażu na pożywkę regeneracyjną, był jeszcze bardziej zróżnicowany pod względem udziału komórek o różnej ploidalności niż twardy. Obserwowano trzy główne typy kalusa luźnego: 2C, 4C i 8C (odpowiednio z przewagą komórek z 2C, 4C i 8C DNA). Ten ostatni typ nie wystąpił w kalusie luźnym, uzyskanym z roślin transformowanych. Z otrzymanych z roślin nietransformowanych 6 kalusów luźnych zregenerowało 15 roślin, z których 3 były diploidami, podobnie jak rośliny wyjściowe, a u 11 obserwowano podwojoną w stosunku do roślin wyjściowych ploidalność. Jedna roślina była miksoploidalna. Spośród trzynastu roślin zregenerowanych z kalusa pochodzącego z roślin wykazujących ekspresję genu *gfp*, 4 były diploidalne, 7 tetraploidalnych, a 2 miksoploidalne (tab., rys.). Tak jak stwierdzono w badaniach nad transformacją pomidora, ploidalność zregenerowanych roślin jest zależna od genotypu i zastosowanej procedury transformacji genetycznej (19). Jednakże, na podstawie uzyskanych przez nas wyników wydaje się, że niestabilność genomu transformantów, podobnie jak roślin nietransformowanych, wynika raczej z polisomatyczności eksplanatu oraz występowania endoreplikacji w czasie proliferacji i różnicowania komórek kalusa, niż z samej transformacji. Obecność roślin o podwyższonej ploidalności i miksoploidalnych wśród regenerowanych *in vitro* roślin obserwowano także u takich gatunków jak ogórek (11), burak cukrowy (12), tytoń (5) czy ziele św. Jana (*Hypericum perforatum* L.; 20). W przeciwieństwie do wymienionych gatunków, rośliny jodły srebrnej (21), cyklamena (22), eukaliptusa (23) i maliny mo-

roszki (9) rosnące w kulturach *in vitro* są stabilne pod względem zawartości DNA, co świadczy o zależności genetycznej stabilności kultur tkankowych od gatunku.

Tabela

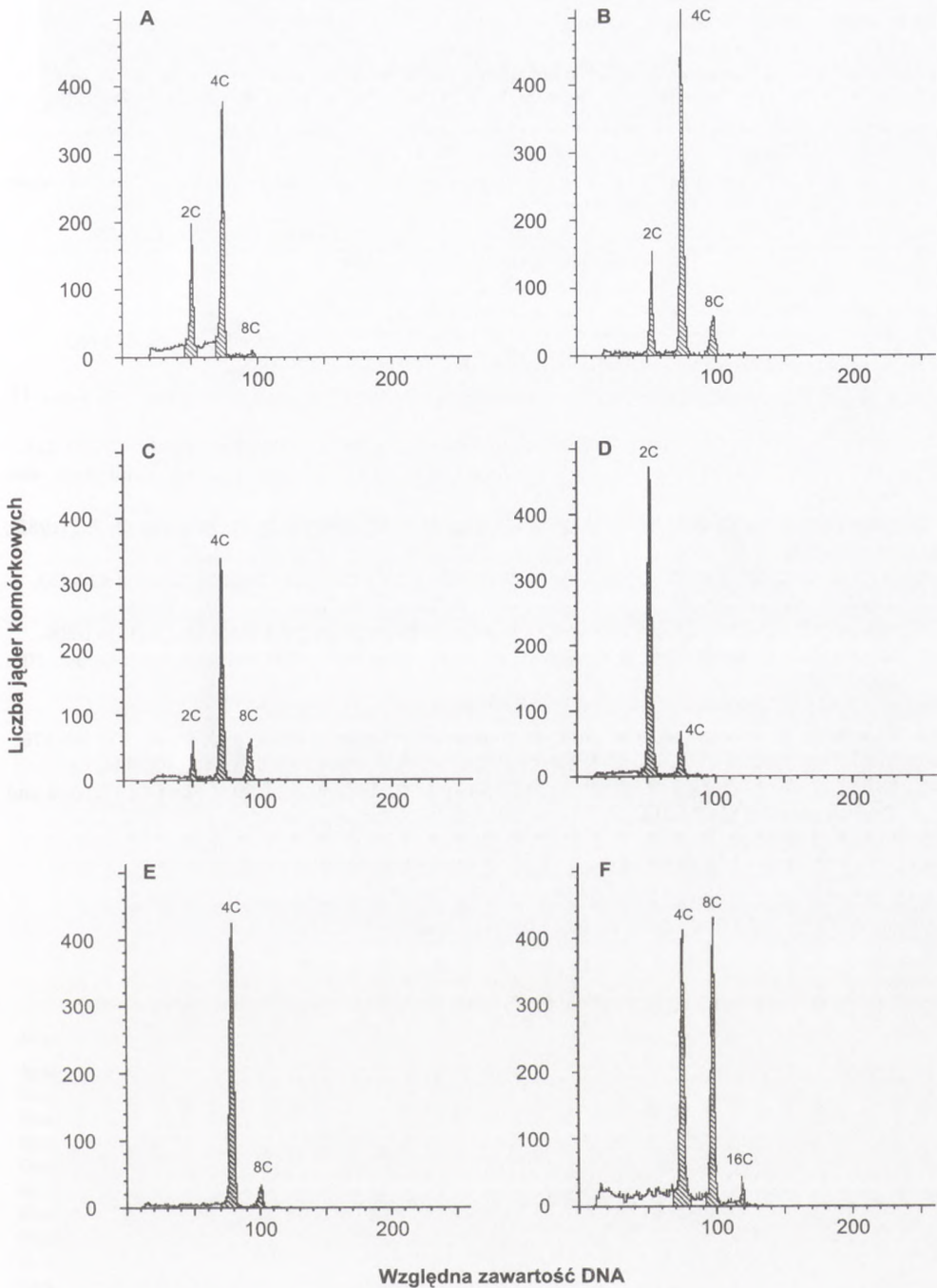
Procentowy udział komórek o różnej zawartości DNA w tkankach roślinnych na różnych etapach hodowli tkankowej

Etap hodowli tkankowej	Rośliny nietransformowane					Rośliny transformowane				
	Liczba pomiarów	Procentowy udział komórek o zawartości DNA				Liczba pomiarów	Procentowy udział komórek o zawartości DNA			
		2C	4C	8C	16C		2C	4C	8C	16C
eksplantat	12	46,4	52,1	1,2	0	12	32,7	64,5	2,8	0
kalus twardy										
– typ 4C	5	15,9	61,9	20,7	1,5	10	11,2	75,2	12,8	0,8
– typ 8C	7	1,1	24,2	68,1	6,6	2	0	17,4	77,3	5,3
kalus luźny										
– typ 2C	2	74,2	23,6	2,2	0	1	77,2	21,4	1,4	0
– typ 4C	2	0	77,2	21,3	1,5	5	7,5	66,8	24,3	1,4
– typ 8C	2	0	28,9	60,7	10,4	0				
zregenerowane rośliny (liść)										
– diploidy	3	85,1	14,6	0,3	0	4	86,9	12,6	0,5	0
– tetraploidy	11	0	83,9	16,1	0	7	0	86,2	13,8	0
– miksploidy										
– 4C/2C	0					1	30,7	50,3	18,4	0,6
– 4C/8C	1	0	53,4	44,2	2,4	1	0	51,4	44,5	4,1

4. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że obecność w eksplantatach i kalusie tytoniu komórek o podwyższonej w stosunku do roślin wyjściowych zawartości DNA może powodować brak stabilności poziomu ploidalności zregenerowanych roślin. Przyczyną obserwowanej poliploidalności może być obecność regulatorów wzrostu w pożywce. W przypadku tego gatunku należy zatem ze szczególną ostrożnością planować skład hormonalny pożywek, na których się rozwijają, a podczas trwania kultury i po jej zakończeniu pożądana jest kontrola cytologiczna.

Porównując udział komórek o różnej zawartości DNA na różnych etapach kultur *in vitro* w tkankach tytoniu pochodzących z roślin transformowanych i nietransformowanych, w obu rodzajach materiału roślinnego obserwowano podobne tendencje zmian. Świadczy to o braku wpływu transformacji genetycznej na ploidalność analizowanych tkanek i zregenerowanych roślin.



Rys. Histogramy zawartości DNA w jądrach tytoniu transformowanego genem *gfp*, wyizolowanych z: A – eksplantatu, B – kalusa twardego typu 4C, C – kalusa luźnego typu 4C, D – zregenerowanej rośliny diploidalnej, E – zregenerowanej rośliny tetraploidalnej, F – zregenerowanej rośliny miksploidalnej.

Literatura

1. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
2. Karp A., Wu Q. S., Steele S. H., Jones M. G. K., (1987), *Theor. Appl. Genet.*, 74, 140-146.
3. Orton T. J., (1980), *Theor. Appl. Genet.*, 89, 287-292.
4. Lee M., Phillips R. L., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 39, 413-437.
5. Gilissen L. J. W., van Staveren M. J., Hakkert J. C., Smulders J. M., Verhoeven H. A., Creemers-Moleenaar J., (1994), *Plant Sci.*, 103, 81-91.
6. Smulders M. J. M., Rus-Kortekaas W., Glissen L. J. W., (1995), *Plant Sci.*, 106, 129-139.
7. Śliwińska E., (1993), *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 1, 10-15.
8. Śliwińska E., (2002), *Biotechnologia*, 1, 122-128.
9. Thiem B., Śliwińska E., (2003), *Plant Sci.*, 164, 129-134.
10. Rival A., Beule T., Barre P., Hamon S., Duval Y., Noirot M., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 884-887.
11. Kubaláková M., Doležel J., Lebeda A., (1996), *Biol. Plant.*, 38, 475-480.
12. Jacq B., Tétu T., Sangwan R. S., de Laat A., Sangwan-Norreel B. S., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 329-333.
13. Kevers C., Greimers R., Franck T., Bisbis B., Dommes J., Gaspar T., (1999), *Biol. Plant.*, 42, 321-332.
14. Troczyńska J., Cegielski R., Flasiński S., Drozdowska L., (2003), *Postępy Nauk Rolniczych*, 488, w druku.
15. Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. R., Ayres N. M., Sharma D. P., Firoozabady E., (1983), *Science*, 220, 1049-1051.
16. George E. F., (1993), *Plant Propagation by Tissue Culture*, Exegetics Ltd., England, London 420-433.
17. Tibok A., Blackhall N. W., Power J. B., Davey M. R., (1995), *Plant Sci.*, 110, 139-145.
18. Palomino G., Doležel J., Cid R., Brunner I., Méndez I., Rubluo A., (1999), *Plant Sci.*, 141, 191-200.
19. Ellul P., Garcia-Sogo B., Pineda B., Rios G., Roig L.A., Moreno V., (2003), *Theor. Appl. Genet.*, 106, 231-238.
20. Brutovská R., Čellárová E., Doležel J., (1998), *Plant Sci.*, 133, 221-229.
21. Gajdošová, B. Vooková, A. Kormuták, G. Libiaková, J. Doležel, (1995), *Biol. Plant.*, 37, 169-176.
22. Winkelman T., Sangwan R. S., Schwenkel H. G., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 400-404.
23. Azmi A., Noin M., Landré P., Prouteau M., Boudet A. M., Chriqui D., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 9-16.