

MACIEJ ZENKTELER
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

KONFERENCJA W LEEDS NA TEMAT: „METODY ASEPTYCZNYCH KULTUR W HODOWLI ROŚLIN“

W dniach od 9—13 lipca 1973 r. EUCARPIA (European Association for Reserach in Plant Breeding) zorganizowała na uniwersytecie w Leeds (Anglia) konferencję poświęconą zastosowaniu metod aseptycznych kultur w hodowli roślin. W obradach uczestniczyło ok. 150 osób reprezentujących szereg krajów zachodniej Europy, kilka osób przyjechało z USA i Kanady, dwie osoby z Węgier, z Polski autor był jedynym reprezentantem. Konferencja była zorganizowana bardzo sprawnie, obrady odbywały się codziennie w godzinach od 9 rano do 6 po południu, z godziną przerwą na obiad. Ogółem wygłoszono 40 referatów, w przerwach między obradami oraz wieczorami wolny czas przeznaczony był na dyskusje i rozmowy.

Problematyka konferencji dotyczyła następujących zagadnień: technika kultur, praktyczne zastosowanie kultur, genetyczna i cytologiczna stabilność tkanek i organów w kulturach, kontrola nad rozwojem komórek i tkanek w kulturach, hodowla pyłków i zarodków.

Technika kultur miała być przedstawiona w 5 referatach, niestety dwóch referentów nie przyjechało. Leakey z Cambridge przedstawił prostą technikę płynnych kultur dla nasion storczyków. Technika ta, która umożliwia uzyskiwanie normalnie rozwiniętych roślin, może być z powodzeniem stosowana przez amatorów hodowli storczyków w warunkach domowych. W drugim referacie mówił o korzyściach jakie daje metoda sztucznych kultur w produkcji dużej liczby roślin mieszańcowych z zarodków niektórych przedstawicieli rodziny motylkowatych. Jako przykład podał soję i orzeszki ziemne, które są roślinami samopylnymi. W normalnych warunkach, celem otrzymania mieszańców pokolenia F_1 , rośliny muszą być ręcznie kastrowane i zapylane co jest bardzo czasochłonne i kosztowne. W przypadku stosowania sztucznych kultur można krzyżowo zapylać niewielką tylko liczbę kwiatów i następnie z zarodków mieszańcowych przeniesionych na pożywki uzyskuje się dodatkowe zarodki. Praktycznie więc, drogą jakby wegetatywnego rozmnażania, można z jednego zarodka otrzymać ogromną liczbę mieszańcowych roślin. Referat Henshawa z Birmingham dotyczył możliwości przechowywania w niskiej temperaturze płynne-

go azotu (-196°C) cennych z punktu widzenia genetycznego tkanek kalusowych. Należałoby stworzyć coś w rodzaju banku kultur tkankowych o wysokich wartościach genetycznych, z którego możnaby korzystać w nieograniczonym czasie.

O praktycznym zastosowaniu sztucznych kultur mówiło 5 referentów. Głównie zwracano uwagę na doniosłą rolę, jaką spełnia ta metoda w uzyskiwaniu roślin niezawirusowanych. Boxus z Gembloux, Belgia, wykazał na przykładzie truskawki, jak z jednego merystemu rośliny zawirusowanej można w ciągu 8 miesięcy otrzymać 160 000 czystych roślin. Podobne możliwości istnieją w przypadku hodowania na pożywkach merystemów z kielkujących nasion jabłoni (Walkey z Warwick, Anglia) oraz z merystemów pąków kalafiora (Crips z Warwick). Wśród roślin cebulkowych mało jest gatunków, które są zdolne w ciągu jednego roku wyprodukować dużą liczbę potomstwa. Ponadto, potrzeba od 10 do 20 lat na to, ażeby wyselekcjonować odpowiedniego mieszańca i wprowadzić go do masowej eksploatacji. Usiłuje się więc skrócić ten długi okres przez stosowanie metody hodowli *in vitro*. Hoduje się tkanki merystematyczne i uzyskuje w ciągu jednego sezonu z każdego merystemu szereg roślin np. u gatunków z rodzin *Iridaceae*, *Liliaceae* *Ameryllidaceae* (Hussey z Norwich, Anglia). Clare z Liverpool mówiła na temat hodowli merystemów brukselki, gatunku, który należy do roślin samoniezgodnych. W warunkach hodowli *in vitro*, z merystemu jednej tylko rośliny otrzymuje się szereg identycznych osobników.

Na temat genetycznej i cytologicznej stabilności tkanek i organów ogłoszono 4 referaty. W tkankach kalusowych oraz w komórkach pojedynczych (w suspensjach) obserwuje się liczne zaburzenia w podziale jąder co doprowadza w konsekwencji do powstawania komórek poliploidalnych i aneuploidalnych. Zakłócenia w podziałach zachodzą częściej w kulturach starszych. Niemalą rolę odgrywa także skład pożywki, zwłaszcza auksyny i cytokininy wpływają na poliploidalność komórek. Ciekawy jest fakt, że w przypadku hodowli merystemów mitozy zachodzą prawidłowo i dlatego, dzięki dużej stabilności kultur merystematycznych, uzyskuje się organizmy, które pod względem liczby chromosomów nie różnią się od materiału wyjściowego (Bayliss z Leicester). W przypadku jednak hodowli *in vitro* merystemów chryzantem (z jednego merystemu w płynnej pożywce na aparacie rotacyjnym otrzymano w ciągu 6 miesięcy 100 000 pąków) okazało się, że u ok. 28% roślin zaszły mutacje, które objawiały się w różnym zabarwieniu kwiatów, kształcie liści, odmiennym reagowaniu na fotoperiod itp. Należy jednak pamiętać, że w merystemach wierzchołkowych łądy u chryzantem, nawet w warunkach naturalnego ich rozwoju, zachodzą

mutacje genetyczne i pewne zmiany somatyczne (Machin z Chichester, Anglia). Staudt z Siebeldingen, NRF, mówiąc na temat cytologii tkanek kalusowych pochodzących z diploidalnych i tetraploidalnych roślin *Vitis vinifera* stwierdził, że na pożywkach płynnych znacznie częściej znajduje się komórki poliploidalne niż na pożywkach agarowych. Okamoto (Japończyk, który przebywa od wielu lat w USA i NRF) charakteryzował pod względem kariologicznym tkanki kalusowe pszenicy — *Triticum aestivum* var. Chinese Spring. Główną uwagę poświęcił liczbie chromosomów oraz obecności chromosomów telocentrycznych.

Dziewięć referatów dotyczyło rozwoju tkanek i organów w kontrolowanych sztucznych warunkach hodowli. Powyższa grupa tematyczna odbiegała nieco od pozostałych pod tym względem, że referowane prace często dotyczyły badań podstawowych i nie zawsze nawiązywały do hodowli roślin. Referat Buiattiego z Pizy, Włochy, poświęcony był charakterystyce fizjologicznej tkanek kalusowych pochodzących z 6 linii *Brasica oleracea* var. *botrytis*. O roli auksyn w procesie powstawania pąków z tkanek kalusowych trzciny cukrowej oraz o potencjach rizogennych tkanek palmy *Elaeis guineensis* mówi. K. Smith z Sharnbrook, Anglia. Nag z Leicester referował część badań wykonywanych obecnie w pracowni prof. Streeta a dotyczących potencji embriogenetycznych pojedynczych komórek korzenia marchwi hodowanych w płynnych pożywkach. Kessel z Bedford, Anglia, mówił o dużej roli jaką odgrywa koncentracja rozpuszczalnego tlenu w pożywce w procesie embriogenezy. O próbach hodowli *in vitro* fragmentów pąków *Asparagus officinalis* i analizie anatomicznej tych pąków oraz uzyskanych z nich kalusów i korzeni mówił Aynsley z Twyford, Anglia. Renter z Geisenheim, NRF, przeprowadził charakterystykę tkanek kalusowych uzyskanych ze stożków wzrostu *Pelargonium pelatum* × *P. zonale*. Modyfikowano skład pożywki, szczególnie zwracano uwagę na rolę auksyn i kinetyny. Stwierdzono, że kinetyna wpływa na powstawanie komórek poliploidalnych oraz na tworzenie się ścian wtórnych. Dutuit z Orsay, Francja, w pracy nad hodowlą *in vitro* tkanek *Vicia faba* wykazał jak ważną rolę odgrywa stan aktywności fizjologicznej eksplantatów pobieranych do doświadczeń oraz koncentracja związków chemicznych obecnych w pożywce. Problem zakwitania roślin marchwi, które otrzymano z pojedynczych komórek wg metody Stewarda, referował Jones z Beds, Anglia. Na temat morfogenezy izolowanych i hodowanych *in vitro* komórek liści *Quamoclit cocciena* (*Convolvulaceae*) mówił Kohlenbach z Frankfurtu, NRF. Izolowane komórki palisadowe (cięto skrawki liści, ustawiano na wstrząsarce i sączono) po umieszczeniu w pożywce z różnymi dodatkami

auksyn i kinetyny dzieliły się, powstawała tkanka kalusowa, z której następnie wyrastały korzenie.

Bogato była reprezentowana tematyka związana z hodowlą pyłków i zarodków. Nitsch z Gif-sur-Ivette, Francja, w oparciu o wieloletnie prace nad indukcją zarodków z pyłków zwróciła uwagę w swym referacie na dwa czynniki, które odgrywają dużą rolę w procesie androgenezy: a) niska temperatura (pąki z których wyszczepiano pylniki umieszczano w wodzie przez 48 godz. w temp. 3°C); b) wyciąg z pylników, w których zachodzi proces androgenezy (hodowano pylniki pomidora na pożywce, do której dodawano wyciąg z pylników tytoniu). W oparciu o dotychczasowe badania nad hodowlą *in vitro* pylników wiadomo, że nie zawsze uzyskane z pyłków rośliny są haploidalne, zdarzają się także di, tri, tetra, penta i heksaploidalne. Engvild z Riso, Dania, wykazał, że istnieje zależność między stadium rozwojowym wyszczepianych pylników a ploidalnością rozwijających się zarodków. W przypadku *Datura innoxia* z pylników wyszczepianych w stadium mikrospor powstawały tylko haploidy, w stadium młodych 2-komórkowych pyłków tylko diploidy i w stadium starszych 2-komórkowych pyłków diploidy i triploidy. Picard z Orsay, przedstawił dotychczasowe wyniki doświadczeń nad hodowlą pylników *Triticum aestivum*, szczególnie omawiał zestaw stosowanych pożywek. Niestety, jak na razie, nie udało się znaleźć optymalnej pożywki. O uzyskaniu wegetatywnej tkanki z hodowanych *in vitro* pylników truskawki i *Salpiglossis (Solanaceae)* mówił Janick z Lafayette, USA. Sunderland z John Innes Institute, Anglia, przedstawił pracę na temat indukcji procesu androgenezy w pylnikach *Solanum tuberosum*. Otrzymano kilka roślin zawierających haploidalną (dihaploidalną) liczbę chromosomów. O dotychczasowych wynikach badań nad uzyskiwaniem zarodków i roślin z pyłków *Atropa belladonna*, *Solanum dulcamara* i *Lycium halimifolium* mówił Zenkteler. Ponadto, zostały także przekazane informacje na temat tegorocznych doświadczeń dotyczących powstawania haploidalnych zarodków z pyłków *Hordeum vulgare* (3 odmiany), *Festuca pratensis* i *Secale montanum*. Debergh z Gent, Belgia, mówił o udanych pracach dotyczących hodowli pyłków pomidora w płynnych pożywkach. Rashid z Leicester referował pracę na temat hodowli *in vitro* pylników *Atropa belladonna* na prostych pożywkach bez dodatku substancji wzrostowych. Jeden referat wygłoszony przez Norreel z Gif-sur-Ivette dotyczył badań cytochemicznych wczesnych stadiów rozwojowych androgenicznych zarodków u kilku przedstawicieli rodziny *Solanaceae*. Pelletier z Orsay mówił o korzyści jaką daje metoda niańki (nurse tissue technic) w procesie androgenezy pojedynczych pyłków tytoniu.

Niektóre międzygatunkowe zarodki w rodzaju *Lilium* zamierają we wczesnych stadiach rozwojowych z powodu nienormalnego wykształcania się bielma. W innych krzyżówkach, zarodki osiągają dojrzałość ale nasiona nie kiełkują. W obu przypadkach dzięki izolacji zarodków i hodowli na pożywce można otrzymać nowe mieszańcowe rośliny. Metoda sztucznych kultur umożliwia także rozwój triploidalnych roślin w tych przypadkach kiedy krzyżując diploidy z tetraploidami nie wykształcają się żywotne nasiona (North z Dundee, Szkocja). Opracowano metodę uzyskiwania monoploidalnych zarodków jęczmienia z żeńskiego gametofitu. Polega ona na tym, że krzyżuje się *Hordeum vulgare* \times *H. bulbosum*. Kilka dni po zapłodnieniu chromosomy *H. bulbosum* zostają wyeliminowane z rozwijającego się zarodka i w konsekwencji, dalej wykształcające się zarodki zawierają tylko chromosomy *H. vulgare*. Zarodki te, raczej prazarodki, w normalnych warunkach zamierają 2—3 tygodnie po zapłodnieniu. Po przeniesieniu ich jednak do pożywki osiągają dojrzałość i tworzą w pełni wykształcone haploidalne rośliny (Jensen z Riso, Dania). Metoda zapylania *in vitro* zalążków została omówiona przez Zenktelera. Obiektem doświadczalnym były zalążki *Melandrium album*, które zapylano pyłkiem pochodzącym z kilku gatunków rodziny Caryophyllaceae, po jednym gatunku z rodziny Cruciferae, Campanulaceae i Solanaceae. Harberd z Leeds przedstawił pracę na temat hodowli *in vitro* zalążków z zarodkami. W krzyżówkach międzygatunkowych w obrębie *Brassica* otrzymuje się często zarodki tylko w stadium kulistym lub sercowatym. Chcąc pobudzić je do dalszego rozwoju, izoluje się zalążki i przecina w pół (odcięcie ułatwia bezpośredni dopływ pożywki do zarodka), a dopiero następnie przenosi się do płynnych pożywek w aparacie rotacyjnym. Dzięki tej metodzie otrzymano około 100 nowych mieszańców międzygatunkowych i 8 międzyrodzajowych.

Trzy referaty stanowiły jakby próbę spojrzenia w przyszłość i perspektyw stosowania sztucznych kultur. Cocking z Nottingham rozwinął temat związany z hodowlą *in vitro* nagich protoplastów, zwrócił też uwagę na możliwość łączenia protoplastów różnych gatunków. Autor sugerował, że poprzez fuzję protoplastów będzie można dostarczyć hodowcom metodę dla uzyskiwania nowych mieszańców, których w normalnych warunkach płciowego rozmnażania nie udaje się otrzymać. Melchers z Tübingen, NRF, podkreślał ogromne znaczenie jakie będzie miała metoda hodowli *in vitro* pylników dla produkowania na wielką skalę haploidów. Apelował o prowadzenie jak najszerszych badań nad roślinami homozygotycznymi, głównie pod kątem wyselekcjonowania mutantów odpornych na choroby. Maliga (Węgier, czasowo przebywający w Tübingen) mówił o wyhodowa-

niu z tkanek kalusowych tytoniu komórek odpornych na streptomycynę. Otrzymane z tych komórek rośliny i ich potomstwo również wykazywały taką samą odporność. Autor sugerował, ażeby w podobny sposób wyodrębnić wartościowe mutanty z tkanek kalusowych innych, ekonomicznie ważnych roślin.