

VÆVSKULTUR AF NÅLETRÆER

af

P. Krogstrup, adjunkt, lic.agro &

J. Dahl Møller, lektor, cand.scient.

Botanisk Have. Københavns Universitet.

Øster Farimagsgade 2B. DK 1353 København K.

TISSUE CULTURE OF CONIFERS

Key words: Tissue culture, somatic embryogenesis, Sitka spruce.

Introduktion

Plantevævskultur er den del af bioteknologien som omhandler steril dyrkning af celler, væv eller organer på et kunstigt sammensat nærings-substrat. Det grundlæggende princip for vævskultur er plantecellers udviklingsmæssige plasticitet, som indebærer, at man kan manipulere gen-udtrykkelsen og derved ændre plantecellers form og funktion. I princippet kan man regenerere en komplet frugtbar plante ud fra en vilkårlig levende celle i plantelegemet, det såkaldte totipotensbegreb.

Planters primære plantelegeme dannes ved celledelinger i de apikale vækstpunkter (meristemer) i kimknop og kimrod. Under plantens vækst og udvikling danner kimens skudvækstpunkt den overjordiske del af planten. Specielt i skovtræer kan man iagttagende, at der i løbet af udviklingen sker ændringer i det oprindelige kimknopmeristem, som derved danner celler, væv og organer med ændrede form- og funktionsmæssige karakterer. Man taler om, at det oprindelige skudvækstpunkt gradvist overgår fra en juvenil (ungdomsmæssig) til en adult (voksen) funktion, og at der sker en ontogenesisk ældelse af skudvækstpunkterne. Af speciel interesse i denne forbindelse er evnen til blomstring samt cellers regenerationsevne, d.v.s. graden af totipotens. Blomstringsevnen er således en adult karakter, som i nåletræer først forekommer efter 30-100 år. Regenerationsevnen, f.eks. evnen til roddannelse i stiklinger, er derimod en juvenil karakter, som i nåletræer aftager kraftigt allerede få uger efter et frøs spiring. Disse forhold frembyder store problemer i forbindelse med forædlingsarbejde og udvikling af vævskulturmetoder indenfor nåletræer. Anvendelse af krydsningsforædling vanskeliggøres således på grund af den lange livscyclus. Selektionsforædling og vegetativ kloning udgør ligeledes et problem, eftersom plusindivider først kan selekteres, når de er adulte, hvilket gør kloningsprocesser vanskelige eller umulige.

I den intakte plante sidder hver enkelt celle fastlåst i et udviklings-

mæssigt form- og funktionsmæssigt hierarki, som opretholdes ved gensidige kemiske og fysiske signaler. Dannelsen af dette overordnede hierarkiske udviklingsmønster sker gradvist under udviklingen som et resultat af et samspil mellem generne og det stadigt skiftende indre og ydre miljø. Dette hierarki er specielt markant hos nåletræer.

Ved anvendelse af vævskultur kan man øge muligheden for en effektiv manipulation af plantecellers gen-udtrykkelse som følge af flere forhold:

1) Ved isolering af celler/væv/organer fra moderplanten og dyrkning i vævskultur frigøres cellerne fra hierarkiet og dets hæmmende signaler. Jo færre celler man isolerer, jo større frihedsgrad opnår de enkelte celler i den isolerede plantedel.

2) Jo færre celler man isolerer, jo mindre er deres evne til produktion af de komponenter, som de normalt får tilført fra specialiserede væv/organer i den intakte plante. Ved at tilføre alle de nødvendige komponenter gennem det kunstige næringssubstrat kan de isolerede celler overleve og dele sig, hvilket muliggør udtrykkelsen af deres nyerhvervede frihedsgrader.

3) Under vævskultur kan man tilføre kemiske forbindelser, d.v.s. vækstregulatorer/plante„hormoner“ gennem længere tid, uden at stofferne nedbrydes af mikroorganismer. Endvidere er det muligt at kontrollere fysiske faktorer såsom lysfarve, lysintensitet, længde af lysperiode, temperatur, luftfugtighed, som påvirker gen-udtrykkelsen.

Regenerationssystemer i nåletræsvævskulturer

Nåletræer er nogle af de første vedplanter, man begyndte at arbejde med i vævskultur. Som følge af nåletræers økonomiske betydning i skovbruget er der siden sat store ressourcer ind på at udvikle vævskulturmetoder indenfor denne plantegruppe til anvendelse i forædlingsarbejdet. Men det er først indenfor de sidste 4 år, at der med udviklingen af regenerationssystemer ud fra enkeltceller er sket et afgørende gennembrud. For de fleste vævskulturteknikker er det således afgørende, at man er istand til at regenerere planter ud fra veldefinerede udgangsceller.

Regeneration af planter i vævskultur kan ske ved to forskellige udviklingsprocesser: a) *organogenese* b) *somatisk embryogenese* hvor organogenese betragtes som den simpleste metode.

Organogenese

Ved *organogenese* dannes skud eller rodvækstpunkter, som kan udvikle unipolære organer, d.v.s. skud eller rødder. Skud dannet ved organogenese kan afskæres fra udgangsvævet og bringes til at danne rødder,

hvorved man har regenereret en komplet plante. Hvis skud dannes udfra celler, der normalt ikke danner skud, taler man om *adventiv organogenese* i modsætning til *axillær organogenese*, hvor skuddene dannes udfra steder, hvor der allerede er anlagt skudvækstpunkter, f.eks. bladhjørner. Sker organogenesen udfra celler med en allerede defineret funktion i plantelegemet, f.eks. epidermisceller, taler man om *direkte organogenese*. Celler, f.eks. epidermisceller, kan imidlertid også manipuleres til at danne uorganiserede cellemasser, kallus, som siden kan danne organer ved såkaldt *indirekte organogenese*.

Regeneration ved organogenese anvendes med stor succes for mange urteagtige planter samt enkelte løvtræer. For nåletræer har metoderne med få undtagelser vist sig at være mindre anvendelige. Det største problem er her den ældelsesbetingede nedgang i cellernes totipotens, hvor det endvidere er karakteristisk, at organogenesen generelt kun kan foregå direkte, d.v.s. uden en kallusfase. Endvidere er strækningsvæksten i skudknopper fra adult materiale reduceret. For regenererede planter kan der endvidere være problemer med kvaliteten af rodsystemet. Problemet kan være utilstrækkelig vasculær forbindelse mellem rod og skud eller dårligt udviklede rødder, som danner et overfladisk og ringe udviklet rodsystem. Til praktiske regenerations systemer er organogenesemetoderne på nuværende stadium kun anvendelige til kloning af juvenil materiale. For adult materiale er metoderne endnu ikke tilstrækkeligt udviklede, men systemerne bliver med stor fordel anvendt som eksperimentelle modelsystemer til at kortlægge mekanismerne i organdannelses-, stræknings- og ældelsesprocesser i nåletræer.

Somatisk Embryogenese

Ved *somatisk embryogenese* forstås en ukønnet udviklingsmæssig proces, hvor der dannes bipolære embryoer udfra somatiske (legems) celler. Disse somatiske embryoer gennemløber udviklingsstadier som anatomisk og fysiologisk svarer til udviklingsforløbet hos embryoer dannet ved kønnede processer og vil ved spiring danne planter, som genetisk set svarer til udgangsmaterialet.

Som nævnt er der indenfor de seneste 4 år sket et gennembrud indenfor regeneration ved somatisk embryogenese hos nåletræer. Det har vist sig, at somatisk embryogenese kun kan ske ved selektion af visse celletyper. Dette forhold samt vanskelighederne ved organogenese i adult materiale stiller spørgsmål ved den absolutte gyldighed af totipotensbegrebet hos nåletræer.

Planteregeneration ved anvendelse af somatisk embryogenese i nåletræer har adskillige fordele. Metoden kan anvendes som modelsystem og rummer mulighed for kvantitative fysiologiske studier af embryoud-

vikling i nåletræer, idet man er i stand til at opnå tilstrækkelige mængder af forskellige udviklingsstadier til kvantitative analyser. De tidlige embryostadier kan ligeledes dyrkes i flydende vævskultur, og det er derved muligt at anvende fermenteringsteknik, d.v.s. bioreaktorer til kultur og styring af udviklingsprocesserne. På længere sigt vil man kunne indstøbe de somatiske embryoer i vandgeler, som skal fungere som kunstig frøkappe til beskyttelse af embryoerne mod udtørring. De indstøbte kim „kunstige frø“, vil siden kunne udplantes og håndteres maskinelt.

Til fordelene hører også at man ved somatisk embryogenese opnår planter med en pælerod som hos almindelige frøplanter.

Somatisk embryogenese i Sitkagran (*Picea sitchensis*)

I den naturlige kønnede, d.v.s. zygotiske embryogenese dannes først en tokernet og siden en firekernet proembryo umiddelbart efter befrugtningen. Ved celledelinger dannes en flercellet embryonal masse samt et vedhæng af primære og sekundære suspensorer. Den fortsatte udvikling resulterer i dannelse af globulære og siden torpedoformede stadier. Derefter udvikles de apikale vækstpunkter. Helt frem til modenhed er suspensorceller tilstede ved basis af den udviklende embryo.

I somatisk embryogenese kan man iagttage de samme stadier som ved den zygotiske embryogenese. Den kritiske faktor for opnåelse af somatisk embryogenese er som nævnt selektion af de rette udgangsceller. Før udviklingen af de første embryogene vævskultursystemer, anvendte man grønne meristematiske celletyper som udgangsmateriale. Dette valg var naturligt, fordi man arbejdede ud fra metoder udviklet for dækfrøede planter og eftersom man regnede med total totipotens i alle planteceller. Det viste sig imidlertid, at disse celler ikke var i stand til at danne somatiske embryoer. Istedet anvendes en hvid, slimet cellemasse bestående af lange suspensorlignende celler.

I det følgende vil somatisk embryogenese i Sitkagran blive beskrevet:

1. Frembringelse og selektion af somatisk embryogene cellemasser. Ved at kultivere umodne eller modne zygotiske kim på et substrat indeholdende bl.a. auxin og cytokinin kan man fremprovokere dannelse af forskellige fænotypisk stabile cellelinier, som kan adskilles i to hovedtyper. (Fig. 1). En hvid slimet embryogen type primært bestående af lange suspensorlignende celler og tidlige embryostadier samt en ikke embryogen og ikke organogen grøn cellemasse bestående af grønne isodiametriske meristematiske celler. (Fig. 2).

2. Opformering af embryogene cellemasser.

Den hvide type kan overføres til flydende kultur eller den kan dyrkes

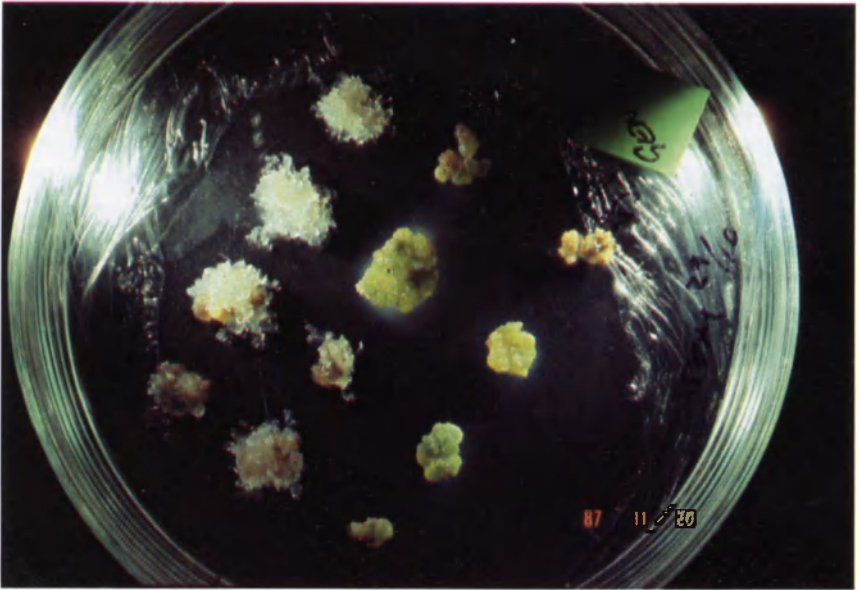


Fig. 1. To hovedtyper af cellelinier dyrket på agar: En hvid, slimet embryogen type, og en grøn ikke embryogen type.

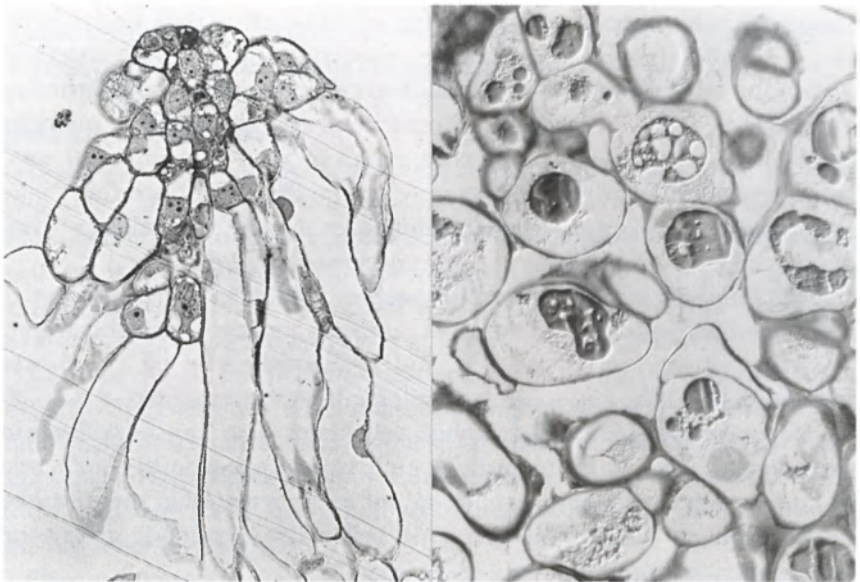


Fig.-2. Snit af de to hovedtyper: T.v. Tidligt embryostadie, t.h. Ikke embryogen grøn cellemasse.

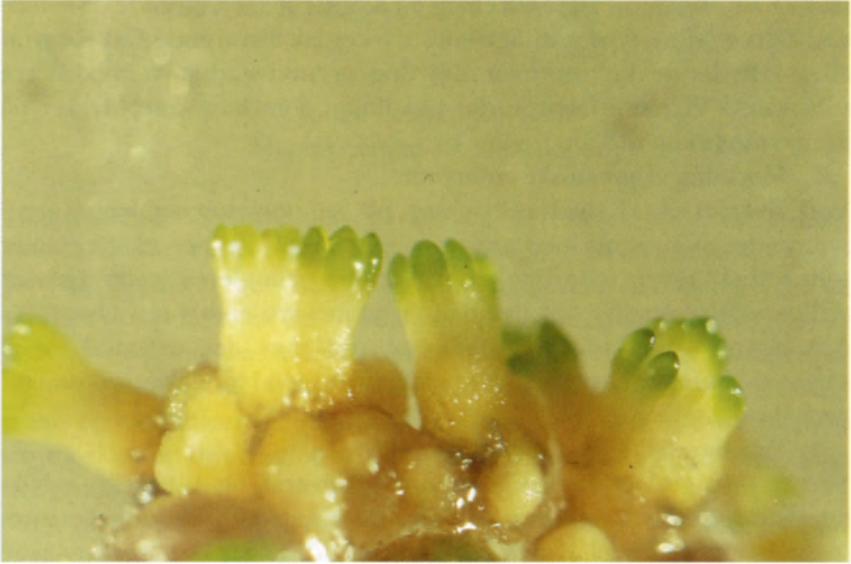


Fig. 3. Kim med kimblade.



Fig. 4. Småplanter udviklet fra somatiske kim.

på fast substrat, hvor den deler sig og danner nye tilsvarende cellemasser. Den grønne type kan ligeledes dyrkes på tilsvarende fast substrat eller i flydende kultur, hvor det dog er nødvendigt at modificere substratet. Vi har i laboratoriet celler, som har været dyrket på denne måde i op til 2 år.

3. Modning af somatiske embryoer.

Ved overførsel af hvid cellemasse på en polyestervævsbærer gennemvædet af substrat med abscisinsyre, en anden type vækstregulator som indgår i den naturlige embryogenese, stimuleres modningen af tidlige embryostadier, og der dannes globulære embryoer. Overføres den grønne type på tilsvarende substrat sker der derimod ingen somatisk embryogenese eller organogenese men blot en fortsat omend nedsat celledeling.

4. Færdigudvikling af somatiske embryoer.

Ved at afsuge det flydende modningssubstrat og tilføje et udviklingssubstrat uden vækstregulatorer, videreudvikles de globulære somatiske embryoer til kim med kimblade. (Fig. 3). Den grønne type fortsætter blot celledelingen som hidtil.

5. „Spiring“ af somatiske embryoer.

Ved regelmæssigt afsugning og tilhældning af nyt væksts substrat sker begyndende strækning af de somatiske embryoer. Kort efter den begyndende skudstrækningsvækst påbegyndes rodudviklingen.

6. Overførsel af somatiske kim til jord.

Disse kim kan nu overføres fra det sterile vævskultursystem til usterilt dyrkningssubstrat, hvor væksten fortsætter efter en kort vækststandsning. De etablerede planter udvikles normalt. (Fig. 4).