



Ocena stabilności genetycznej rozmnażanych *in vitro* polskich odmian tulipanów przy użyciu markerów molekularnych ISSR

Małgorzata Podwyszyńska, Anita Kuras, Małgorzata Korbin
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa im. Szczepana Pieniążka,
Skierniewice

ISSR evaluation of genetic stability of Polish tulip cultivars propagated *in vitro*

Summary

The aim of the study was an early detection of somaclonal variation (SV) which could occur within the micropropagated plant material. Shoot cultures of the Polish cultivars were used. Five cultivars derived from breeder A and four from breeder B. They were propagated *in vitro* for one or two years. The molecular markers (inter-simple sequence repeat, ISSR) were utilized for analysis of putative DNA polymorphism between standard plants (propagated traditionally) belonging to tested cultivars and somaclonal variants derived from them. Within the nine studied genotypes, for five of them, the ISSR analysis performed with ten primers did not reveal polymorphism between standard and micropropagated plants. The analysis of the other four cultivars, all derived from breeder B, showed that some of the plants, micropropagated either for one or two years, differed slightly from standard. Basing on ISSR data, the UPGMA dendrogram showing genetic similarity of the analysed plants was generated and clusters grouping cultivars, their standards and micropropagated plants were noted.

Adres do korespondencji

Małgorzata Podwyszyńska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarnictwa
im. Szczepana Pieniążka,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

2 (89) 105–113 2010

Key words:

somaclonal variation, tulip, molecular markers, ISSR analysis.

1. Wstęp

Zmienność, która występuje podczas mikrorozmnażania wegetatywnego, zwłaszcza w kulturach *in vitro*, została zdefiniowana przez Larkina i Scowcrofta w 1981 r. (1) i nazwana zmiennością somaklonalną. Powszechnie uważa się, że zmienność somaklonalna jest wynikiem zmian trwałych – genetycznych lub przejściowych i czynników je wywołujących (2,3). Spontaniczne mutacje występują z częstotliwością 10^{-4} - 10^{-7} , w zależności od genu. W kulturach *in vitro* częstotliwość ich występowania jest znacznie wyższa, w pewnych warunkach może sięgać nawet kilku procent na locus (4). Częstotliwość pojawiania się mutacji zależy od wielu czynników: genotypu, poziomu ploidalności, rodzaju eksplantatów, systemu regeneracji, składu pożywki i czasu kultury (5).

W warunkach *in vitro* organizmy żywe są narażone na liczne czynniki stresowe wywołujące zmiany genetyczne i epigenetyczne. Zmienność częściej pojawia się w kulturach zarodków lub pędów przybyszowych (6). Najbardziej występuje, gdy stosuje się technikę regeneracji pędów kątowych – używaną najczęściej w mikrorozmnażaniu (6-8). Wymienieni autorzy potwierdzali wysoką stabilność genetyczną tak rozmnażanego materiału roślinnego palmy daktylowej, banana i gerbery także przy użyciu markerów molekularnych. Regulatory wzrostu, zwłaszcza stosowane w wysokich stężeniach, takie jak 2,4-D czy cytokininy, w tym TDZ, stymulujące podziały komórkowe oraz długi czas trwania kultury (w ciągu którego tkanki ulegają częstym zranieniom podczas podziału) także zwiększają częstotliwość pojawiania się odmiennych fenotypów, tzw. somaklonów (wariantów somaklonalnych).

We wcześniejszych badaniach wykazano, że tulipany odmian modelowych – 'Blue Parrot' i 'Prominence', rozmnażane metodą *in vitro*, stosowaną w prezentowanej pracy, mogą ulegać mutacjom (9-11). Metoda ta polega na stymulowaniu regeneracji pędów przybyszowych przy użyciu TDZ. Zmiany fenotypowe stwierdzone na podstawie obserwacji roślin kwitnących dotyczyły deformacji organów kwiatowych, zmiany koloru kwiatów, nieprawidłowej morfologii liści, pojawiły się też chimery typu *variegata* o liściach białozielonych. Na podstawie analizy genetycznej losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD) i polimorfizmu odcinków DNA pomiędzy mikrosatelitami (ISSR) oraz analizy cytologicznej przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) potwierdzono genetyczny charakter zmian (10,11). Jednocześnie wykazano, że częstotliwość występowania zmienności rośnie w miarę wydłużania okresu rozmnażania. Jest wysoka wśród roślin rozmnażanych dłużej niż przez trzy lata i sięga nawet 50-100%. Niemniej jednak opracowana metoda pozwala przyspieszyć rozmnożenie nowych odmian i uzyskać materiał elitarny wolny od wirusów – patogenów, które w ostatnich latach stały się najpoważniejszym problemem w uprawie tulipanów.

Celem badań było monitorowanie zmienności, która mogła wystąpić w elitarnym materiale roślinnym nowych odmian tulipanów, który rozmnożono *in vitro* nowo opracowaną metodą (12).

2. Materiał i metodyka badań

Materiał badawczy stanowiły tulipany polskich odmian dwóch hodowców A i B. DNA izolowano z liści roślin wzorcowych rozmnożonych tradycyjnie (pochodzących z tego samego klonu co rośliny mateczne użyte do zapoczątkowania kultur *in vitro*) oraz z pędów roślin rozmnażanych *in vitro* w ciągu 1-2 lat metodą opracowaną we wcześniejszych badaniach (12). Z roślin wzorcowych rosnących w gruncie próby liści do analizy DNA pobierano na początku maja.

Izolację genomowego DNA przeprowadzono korzystając z komercyjnych zestawów Genomie Mini AX PLANT (A&A Biotechnology). Analizę polimorfizmu prowadzono metodą ISSR w reakcjach z dziesięcioma starterami: 824, 843, 844, 845, 846, 852, 853, 857, 873, 895 (University of British Columbia, Canada).

W pierwszym etapie badań – nad identyfikacją odmian, użyto wyłącznie DNA wyizolowanego z roślin rozmnażanych tradycyjnie. Użyto jedenastu odmian: sześć odmian hodowcy A (nazwy hodowlane – OR, X, NB, The Last, K-C i FFN) oraz pięć odmian hodowcy B (numery hodowlane – 8, 11, 22, 32 i 37). W drugim etapie badań – dotyczącym wykrywania zmienności somaklonalnej, użyto dziewięć spośród wymienionych odmian: rośliny rozmnażane tradycyjnie jako wzorce oraz rośliny pochodzące bezpośrednio z kultur *in vitro* (tab. 1).

Tabela 1

Rośliny użyte do analizy stabilności genetycznej tulipanów rozmnażanych *in vitro* – polskie odmiany hodowcy A i B

Hodowca A			Hodowca B		
Genotyp	Nr próby DNA	Okres rozmnażania <i>in vitro</i> (lata)	Genotyp	Nr próby DNA	Okres rozmnażania <i>in vitro</i> (lata)
OR	1	Wzorzec	nr 11	1	Wzorzec
	2-6	2 <i>in vitro</i>		2	2 <i>in vitro</i>
X	6	Wzorzec	nr 22	3	Wzorzec
	7-10	2 <i>in vitro</i>		4-8	2 <i>in vitro</i>
NB	11	Wzorzec	nr 32	9	Wzorzec
	12-16	2 <i>in vitro</i>		10-14	1 <i>in vitro</i>
The Last	17	Wzorzec	nr 37	15	Wzorzec
	18-21	1 <i>in vitro</i>		16-18	1 <i>in vitro</i>
K-C	22	Wzorzec			
	20-24	1 <i>in vitro</i>			

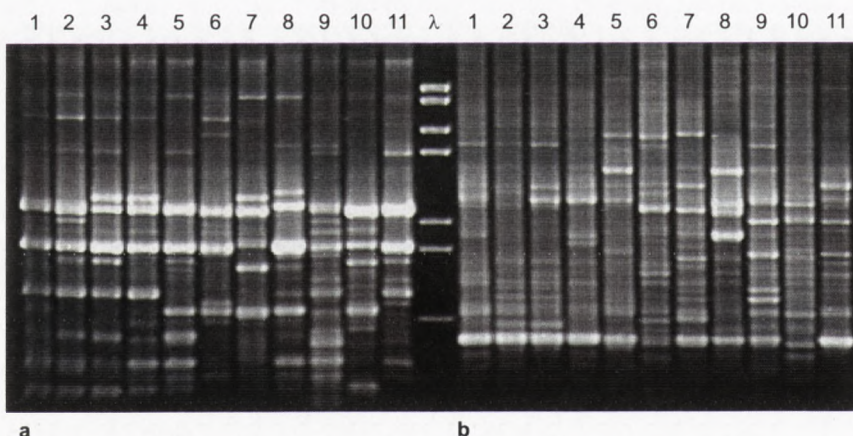
Reakcje PCR, rozdział produktów amplifikacji na żelu agarozowym oraz dokumentację wyników prowadzono jak w przypadku analizy liliowca (13).

Na podstawie danych uzyskanych z analizy polimorfizmu DNA badanych roślin określono pokrewieństwo genetyczne genotypów wzorcowych (rozmnożonych tradycyjnie) i genotypów rozmnożonych *in vitro* (Jaccard Coefficient). Dendrogramy pokrewieństwa opracowano metodą skupień UPGMA używając programu XLSTAT (Adinsoft 2006).

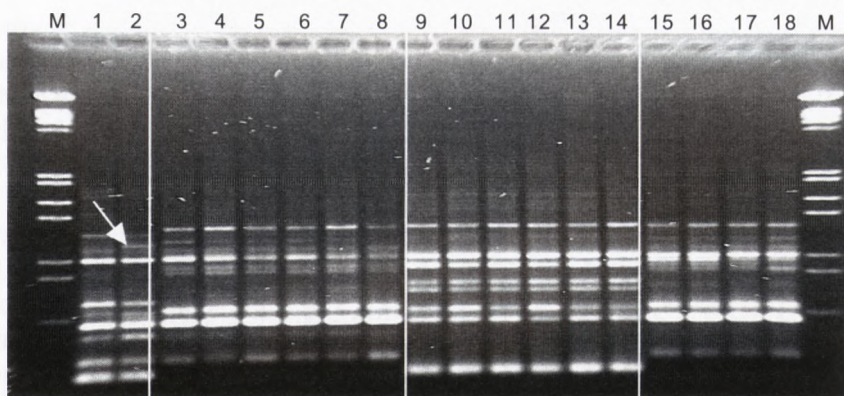
3. Wyniki i dyskusja

W analizie polimorfizmu DNA przeprowadzonej dla roślin jedenastu polskich odmian tulipanów w reakcjach ze wszystkimi starterami uzyskano łącznie 105 produktów polimorficznych różnicujących odmiany. Każdy z testowanych starterów pozwalał na różnicowanie badanych odmian (rys. 1).

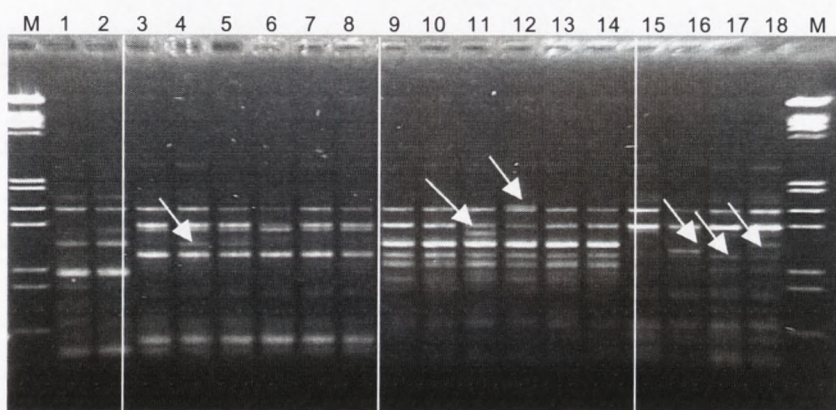
W reakcjach z dziesięcioma starterami ISSR dla pięciu badanych odmian tulipana hodowcy A nie stwierdzono polimorfizmu DNA między analizowanymi roślinami wzorcowymi i roślinami mnożonymi *in vitro*. Na podstawie analizy stabilności odmian hodowcy B wykazano, że stosowana metoda mikrorozmnażania może jednak powodować zmiany w strukturze DNA, na co wskazują wyniki reakcji ze starterami 844, 852, 853 i 873, przedstawiające fragmenty polimorficznego DNA różnicujące rośliny rozmnażane *in vitro* od roślin wzorcowych badanych odmian (rys. 2, tab. 2). U odmiany nr 32 polimorfizmu pomiędzy roślinami wzorcowymi a rozmnażanymi *in vitro* nie wykryto u 3 z 5 analizowanych roślin, a u odmiany nr 37 u 1 z 3 testowanych roślin. W pozostałych przypadkach rośliny z *in vitro* różniły się od wzorców 1 lub 2 polimorficznymi fragmentami DNA. Na podstawie analizy dendrogramów pokrewieństwa przeprowadzonej dla genotypów hodowcy B wyróżniono 4 skupienia



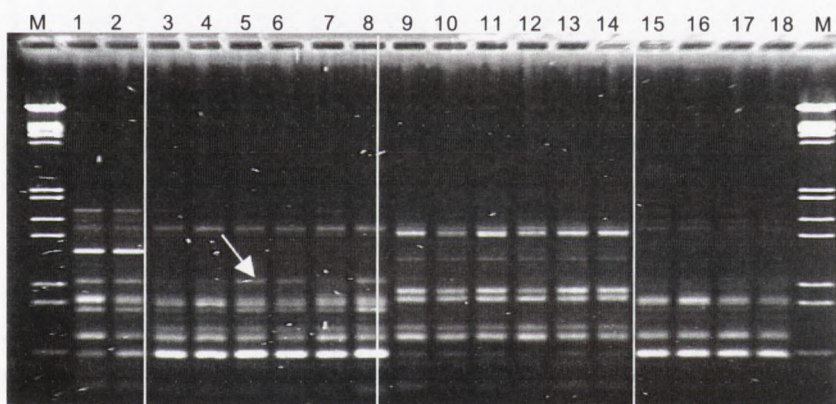
Rys. 1. Elektroforegramy reakcji amplifikacji ISSR ze starterami a) 873 i b) 895 dla polskich odmian tulipanów: 1) OR; 2) X; 3) NB; 4) The Last; 5) K-C; 6) FFN; 7) nr 8; 8) nr 11; 9) nr 22; 10) nr 32; 11) nr 37.



a



b



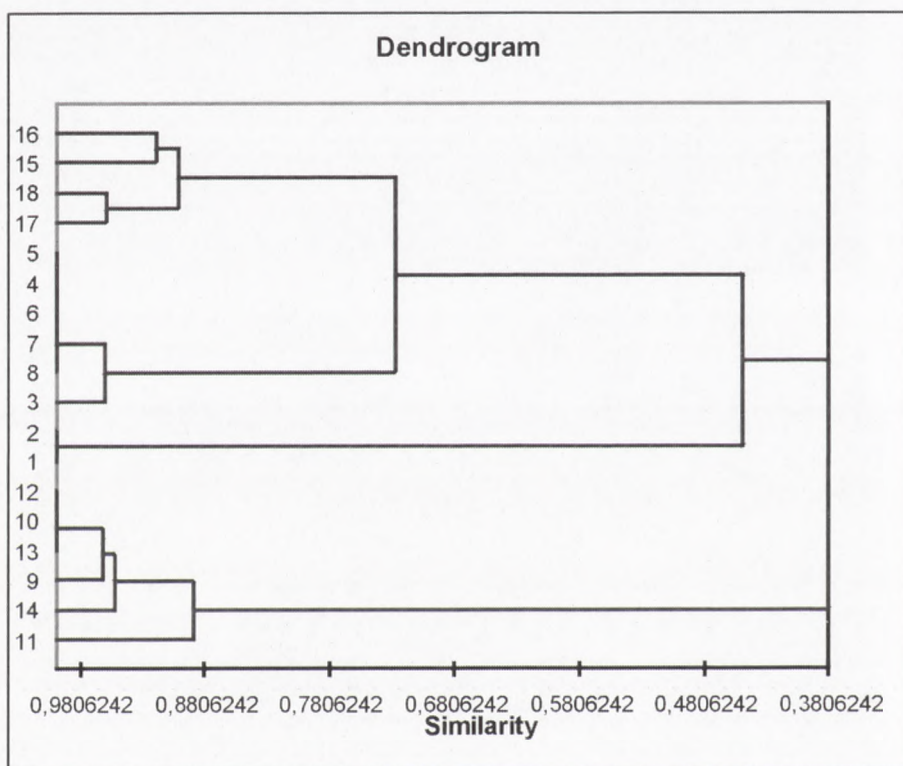
c

Rys. 2. Elektroforegramy reakcji amplifikacji ISSR z wybranymi starterami a) 844, b) 852 i c) 853 dla polskich odmian tulipana hodowcy B – roślin wzorcowych oraz rozmnażanych *in vitro* (opis analizowanych roślin w tabeli 1). Strzałkami zaznaczono fragmenty DNA różnicujące rośliny rozmnażane *in vitro* od roślin wzorcowych danej odmiany.

– oddzielne dla każdej z badanych odmian, składające się z rośliny wzorcowej danej odmiany i jej klonów (rys. 3). Rośliny rozmnożone *in vitro* różniły się minimalnie od wzorca. U odmiany nr 32 – trzy spośród pięciu analizowanych roślin, u odmiany nr 37 – dwie z czterech roślin i nr 22 i 11 – wszystkie rośliny wykazywały bardzo wysoki stopień pokrewieństwa (około 96%).

W 2009 r. u trzech odmian hodowcy A – OR, The Last i NB, zakwitło już ponad 30% roślin i żadna nie wykazywała zmian fenotypowych w odniesieniu do wzorca, natomiast spośród odmian hodowcy B, zakwitły rośliny dwóch odmian nr 11 i nr 22 i u odmiany nr 22 znaleziono kilka roślin o pasiastych liściach z (bezhlorofilową tkanką) (dane nie publikowane). Chimery te pochodziły z tego samego klonu, dla którego na podstawie analizy ISSR wykazano polimorfizm DNA obserwowany pomiędzy wzorcem i mikrorozmnażanymi roślinami. Równocześnie kwiaty roślin genotypu nr 22 nie były zmienione w porównaniu do wzorca.

Przydatność markerów molekularnych do badania zmienności genetycznej roślin znana jest już od niemal 20 lat (14). Markery typu RAPD, ISSR, a ostatnio coraz częściej



Rys. 3. Dendrogram UPGMA uzyskany dla 4 polskich odmian tulipanów hodowcy B – roślin wzorcowych oraz rozmnożonych *in vitro* na podstawie wyników analizy polimorfizmu DNA metodą ISSR: nr 11 (1-2); nr 22 (3-8); nr 32 (9-14); nr 37 (15-18).

Tabela 2

Ocena stabilności genetycznej odmian tulipana hodowcy B przy użyciu techniki ISSR ze starterami, z którymi uzyskano fragmenty DNA różniące rośliny rozmnażane *in vitro* (V) od roślin wzorcowych (Wz); „+” – obecność polimorficznego fragmentu DNA

Starter	Długość fragmentu polimorficznego (p.z)	Odmiany																	
		Nr 11			Nr 22					Nr 32					Nr 37				
		Wz (1)*	V (2)	Wz (3)	V1 (4)	V2 (5)	V3 (6)	V4 (7)	V5 (8)	Wz (9)	V1 (10)	V2 (11)	V3 (12)	V4 (13)	V5 (14)	Wz (15)	V1 (16)	V2 (17)	V3 (18)
844	960		+																
852	1060																	+	
	1080				+														+
	1220										+								
853	950					+		+											
873	570									+				+					
	700									+				+					

* w nawiasach podano numery analizowanych roślin, analogiczne do opisu podanego w tabeli 1 oraz na rysunkach 2 i 3.

polimorfizmu długości amplifikowanego fragmentu (AFLP) stosowane są powszechnie w hodowli do identyfikacji odmian oraz ustalania stopnia podobieństwa pomiędzy genotypami (15). Podkreśla się również użyteczność markerów molekularnych w badaniach zmienności somaklonalnej, zwłaszcza towarzyszącej mikrorozmnażaniu. Zmienność somaklonalną w mikrorozmnażanym materiale roślinnym na poziomie fenotypu a następnie potwierdzoną w analizie genetycznej przy użyciu markerów molekularnych RAPD, ISSR i AFLP wykryto ostatnio u *Oryza sativa* i *Anoectochilus formosanus* (16,17).

Na podstawie wyników analizy ISSR prezentowanych w tej pracy wskazuje się, że już w ciągu pierwszego roku rozmnażania *in vitro* mogą wystąpić zmiany w strukturze DNA. Takie zmiany pojawiły się u czterech z dziewięciu badanych genotypów, co potwierdza fakt, że stabilność genetyczna jest ściśle zależna od genotypu. Jedną z badanych odmian, nr 32 należąca do grupy mieszańców Darwina – jest triploidem, a pozostałe są diploidami. Uważa się, że poliploidy są mniej stabilne genetycznie (18). Opinię taką potwierdziłyśmy również wynikami naszych wcześniejszych badań, w których triploidalna odmiana 'Giewont' charakteryzowała się wyższą zmiennością, wynoszącą 13,8%, stwierdzoną już w materiale rozmnażanym przez 2 lata, w porównaniu z 3% zmiennością obserwowaną u diploidalnych odmian rozmnażanych *in vitro* przez ten sam okres (9,19).

Wydaje się, że występowanie zmienności w mikrorozmnażanym materiale roślinnym tulipanów w dużym stopniu może wywoływać zastosowanie metody rozmnażania *in vitro* – regeneracji pędów przybyszowych w obecności TDZ. Podobną zmienność obserwowano także u liliowca rozmnażanego poprzez pędy przybyszowe, przy użyciu tego samego regulatora wzrostu (13). Należy zaznaczyć, że dla tulipana nie opracowano dotychczas metody opartej na rozmnażaniu pędów/cebulek kątowych, chociaż metoda taka mogłaby być mniej obciążona ryzykiem mutacji. Użyta w tej pracy technologia z wykorzystaniem TDZ jest polecana przede wszystkim do rozmnażania superelity nowych odmian, a zatem do szybkiego rozmnożenia wyselekcjonowanych genotypów do kilkuset czy kilku tysięcy wolnych od wirusów roślin, które następnie mają służyć do rozmnażania elity już tradycyjną metodą. Z tego względu wskazane jest zachowanie ostrożności przy stosowaniu mikrorozmnażania tulipanów. W dalszych etapach produkcji materiału elitarnego nowych odmian konieczne jest prowadzenie starannej obserwacji roślin (głównie w fazie kwitnienia) i usuwanie nietypowych osobników.

Badania dofinansowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, Projekt nr PBZ-MIN-007/P04/2003.

Literatura

1. Larkin P. J., Scowcroft W. R., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
2. Sabała I., Orlikowska T., (1993), *Zesz. Nauk. Inst. Sad. Kwiac.*, 1, 41-57.

3. Jain M., (2001), *Euphytica*, 118, 153-168.
4. Nadolska-Orczyk A., (1991), *Biotechnologia*, 3-4, 120-126.
5. Karp A., (1995), *Euphytica*, 85, 295-302.
6. Bhatia R., Singh K. P., Jhang T., Dharma T. R. (2009) *Scientia Hort.*, 119, 208-211.
7. Saker M. M., Adawy S. S., Mohamed A. A., El-Itriby H. A., (2006), *Biol. Plant*, 50, 188-204.
8. Lakshmanan V., Venkataramareddy S. R., Neelwarne B., (2007), *Electronic J. Biotech.*, 10, 107-113.
9. Podwyszyńska M., (2005), *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 13, 109-122.
10. Podwyszyńska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A., (2006), *Acta Hort.*, 714, 211-219.
11. Marasek-Ciołakowska A., Podwyszyńska M., (2008), *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 2, 65-72.
12. Podwyszyńska M., Marasek A., (2003), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 72, 181-190.
13. Podwyszyńska M., Gabryszewska E., Korbin M., Jasiński A., (2010), *Biotechnologia*, 2, 114-124.
14. Bednarek P. T., Chwedorzewska K., (2001), *Biotechnologia*, 1(52), 9-34.
15. Gostimsky S. A., Kokaeva Z. G., Kononov F. A., (2005), *Russ. J. Genet.*, 41, 378-388.
16. Ngezahayo F., Dong Y., Liu B., (2007), *J. Appl. Genet.*, 48, 329-336.
17. Lin S-F., Asty H. S., Chou T-W., Yang M-J, Cheng K-T., (2007), *J. Food Drag. Anal.*, 15, 156-162.
18. Karp A., (1989), *IAPTC Newsletter*, 58, 1-11.
19. Podwyszyńska M., (2007), Raport Końcowy z realizacji projektu badawczego zamawianego PBZ-MIN-007/P04/2003, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa Sadownictwa, Skierniewice, s. 133.