



Zakład Biologii Stosowanej

## **Stabilność genetyczna roślin maliny i jagody kamczackiej rozmnożonych *in vitro***

Autorzy:

dr Danuta Wójcik, mgr Monika Markiewicz

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.5:**

„System oceny jakości, zdrowotności, czystości odmianowej i tożsamości genetycznej roślin ogrodnich rozmnażanych metodą *in vitro*„

**Programu Wieloletniego IO (2015-2020):**

„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

**Skierniewice 2019**

## 1. Wstęp

Rozmnażanie roślin metodą *in vitro* jest techniką powszechnie stosowaną w produkcji ogrodniczej, wykorzystywaną w produkcji elitarnego materiału szkółkarskiego, w masowej produkcji sadzonek wielu gatunków roślin ogrodniczych (głównie ozdobnych) oraz w pracach hodowlanych. Umożliwia otrzymywanie dużej liczby jednorodnego materiału roślinnego o wysokiej jakości niezależnie od pory roku oraz pozwala na otrzymanie roślin wolnych od patogenów (wirusowych, bakteryjnych czy grzybowych). Technika mikrorozmnażania umożliwia również przyspieszanie prac hodowlanych, a także pozwala na szybkie wprowadzenie na rynek nowych odmian. Hodowla tkanek roślinnych jest także uznawana za jeden z kluczowych obszarów biotechnologii ze względu na jej potencjalne zastosowanie do regeneracji roślinnego materiału elitarnego i zachowania cennych zasobów genetycznych roślin.

W kulturach *in vitro* wymagany jest monitoring pod kątem zdrowotności materiału roślinnego: kontrola obecności mikroorganizmów chorobotwórczych oraz niepatogenicznych gatunków saprofitycznych (bakterii i grzybów), które w specyficznych warunkach kultur tkankowych mogą niszczyć tkanki rośliny i/lub obniżać współczynnik namnażania. Poza zdrowotnością materiału, istotnym zagadnieniem jest tożsamość genetyczna oraz stabilność genetyczna rozmnażanych metodą *in vitro* gatunków i odmian roślin (Butiuc-Keul i in. 2016). Warunkiem pomyślnego wykorzystania technik *in vitro* jest utrzymanie stabilności genetycznej danego genotypu. W kulturach *in vitro* roślin jagodowych, utrzymywanych przez dłuższy czas, często obserwuje się pojawianie zmienności. Zmiany powstałe podczas prowadzenia kultur tkankowych (zmienność somaklonalna) występują głównie w odpowiedzi na stres wywierany na roślinę w warunkach hodowli i mogą mieć charakter trwały (zmienność genetyczna – mutacje, zmiany w ilości lub strukturze chromosomów) lub przejściowy (zmienność epigenetyczna – metylacja DNA) (Gostimsky i in. 2005, Phillips i in. 1994, Hammerschlag 1992, Zenkteler i Zenkteler 2013). Zmienność somaklonalna pojawiająca się w kulturach *in vitro* zależy od wielu czynników, np. rodzaju eksplantatu czy warunków prowadzenia kultur (skład pożywki, użyte substancje wzrostowe, wiek kultury) jak również od stabilności genotypu (Zenkteler i Zenkteler 2013, Deepthi, 2018). W warunkach kultur *in vitro* najczęściej obserwuje się zmienność epigenetyczną, zmiany tego typu mogą dotyczyć cech morfologicznych (kształt i struktura powierzchni liści, obecność kolców czy pokładanie się pędów) lub funkcjonalnych (zwiększona zdolność do tworzenia pędów, opóźnienie okresu tworzenia organów generatywnych, drobnienie owoców). Korzystnym zjawiskiem wynikającym ze zmienności epigenetycznej jest zatrzymanie rozwoju roślin na etapie młodocianym, które skutkuje m.in. zwiększeniem zdolności do ukorzenia sadzonek zielnych i półdREWNIĄŁYCH, co może być wykorzystywane przez szkółkarzy do zakładania wydajnych mateczników z roślin mnożonych techniką *in vitro*. Wiadomym jest, że większość zmian na poziomie DNA nie jest wyrażona fenotypowo (Evans i Bravo 1986), dlatego konieczne jest zastosowanie metod molekularnych w celu ustalenia faktycznego stopnia zmienności genetycznej w roślinach uzyskanych na drodze mikrorozmnażania w porównaniu z rośliną mateczną (Cloutier i Landry 1994).

Przydatność markerów molekularnych do identyfikacji genotypów i oceny ich różnicowania genetycznego zależy od rodzaju starterów użytych do analizy, które powinny generować stabilne polimorficzne produkty amplifikacji (Sztuba-Solińska 2005). Wiele badań wskazuje, że liczba uzyskiwanych produktów polimorficznych jest zróżnicowana i zależy nie tylko od zastosowanego systemu markerów, ale także gatunków roślin. Analiza oparta na markerach DNA pozwala ocenić różnorodność genetyczną odmian, niezależnie od etapu fizjologicznego rośliny czy rodzaju tkanki, z której pobiera się próby do analiz.

Markery molekularne, uzyskane przy pomocy technik takich jak RLFP (restriction fragments length polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA – losowo amplifikowany polimorficzny DNA), SSR i ISSR (Simple Sequence Repeat i Inter Simple Sequence Repeat) oraz AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów), są z powodzeniem wykorzystywane jako narzędzie do badania nie tylko zmienności somaklonalnej, ale także do identyfikacji genotypów, badania tożsamości odmianowej oraz określania pokrewieństwa w obrębie wielu gatunków roślin sadowniczych. Podczas wykrywania zmienności roślin w kulturach *in vitro* i określania ich stabilności najczęściej wykorzystuje się markery RAPD, AFLP oraz SSR (Mohan Jain 2001, Evans i Bravo 1986). W niniejszym opracowaniu do analizy stabilności genetycznej roślin uzyskanych na drodze mikrorozmnażania zastosowano dwie metody oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a mianowicie amplifikacji fragmentów DNA położonych pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi, powtórzonymi regionami, zorientowanymi w przeciwnych kierunkach (ISSR) i polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (AFLP). Markery te zostały wytypowane do oceny stabilności genetycznej roślin uzyskanych na drodze mikrorozmnażania ze względu na wysoką powtarzalność wyników i łatwość aplikacji. Do przeprowadzenia analiz wystarczająca jest niewielka ilość materiału genetycznego, zaprojektowanie tego typu starterów nie wymaga wiedzy o sekwencji DNA, a zastosowanie dwóch rodzajów markerów, amplifikujących różne regiony genomu daje większe szanse na identyfikację zmian genetycznych u badanych roślin (Martins et al. 2005, Arnau i in. 2003).

## 2. Cel badań

Celem badań było określenie stabilności genetycznej roślin maliny i jagody kamczackiej rozmnożonych w kulturach *in vitro* z wykorzystaniem dwóch typów markerów – AFLP oraz ISSR.

### 3. Wyniki

#### 3.1. Wybór markerów do oceny stabilności genetycznej roślin.

W pierwszym etapie badań nad oceną stabilności genetycznej roślin rozmnażanych *in vitro*, przeprowadzono analizę polimorfizmu z wykorzystaniem markerów ISSR oraz AFLP dla matecznych roślin dwóch odmian jagody kaczackiej ‘Wojtek’ oraz ‘Zojka’ i dwóch odmian maliny ‘Polka’ i ‘Polana’ w celu wytypowania starterów w najwyższym stopniu różnicującym badane odmiany. Wykonano analizy z wykorzystaniem 23 starterów ISSR oraz 23 par starterów AFLP dla jagody kaczackiej (Tabela 1) oraz z wykorzystaniem 15 par starterów AFLP dla maliny (Tabela 2) wg metodyki opisanej przez Vos i wsp. (1995).

**Tabela 1. Sekwencje starterów ISSR oraz AFLP wytypowanych do wstępnych analiz oceny stabilności genetycznej roślin jagody kaczackiej rozmnażanej *in vitro*.**

starter ISSR	sekwencja (5'-3')	pary starterów AFLP	sekwencja (5'-3')
UBC 806	(TA) <sub>8</sub> G	<b>Pst-TT/Mse-CC *</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGTT/GATGAGTCCTGAGTAACC</b>
UBC 810 *	<b>(GA)<sub>8</sub>T</b>	Pst-GC/Mse-GC	GACTGCGTACATGCAGGC/GATGAGTCCTGAGTAAGC
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	<b>Pst-GC/Mse-TA *</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGGC/GATGAGTCCTGAGTAATA</b>
UBC 821	(GT) <sub>8</sub> T	Pst-TA/Mse-TA	GACTGCGTACATGCAGTA/GATGAGTCCTGAGTAATA
UBC 822	(TC) <sub>8</sub> A	Pst-TA/Mse-GC	GACTGCGTACATGCAGTA/GATGAGTCCTGAGTAAGC
UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C	Pst-AG/Mse-AG	GACTGCGTACATGCAGAG/GATGAGTCCTGAGTAAAG
UBC 825 *	<b>(AC)<sub>8</sub>T</b>	Pst-AG/Mse-CG	GACTGCGTACATGCAGAG/GATGAGTCCTGAGTAACG
UBC 827 *	<b>(AC)<sub>8</sub>G</b>	<b>Pst-CG/Mse-AG *</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGCG/GATGAGTCCTGAGTAAAG</b>
UBC 828	(TG) <sub>8</sub> A	Pst-TC/Mse-TC	GACTGCGTACATGCAGTC/GATGAGTCCTGAGTAATC
UBC 830	(TG) <sub>8</sub> G	Pst-TC/Mse-AT	GACTGCGTACATGCAGTC/GATGAGTCCTGAGTAAAT
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> CT	Pst-AT/Mse-AT	GACTGCGTACATGCAGAT/GATGAGTCCTGAGTAAAT
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> CT	Pst-AT/Mse-TC	GACTGCGTACATGCAGAT/GATGAGTCCTGAGTAATC
UBC 843	(CT) <sub>8</sub> GA	Pst-AA/Mse-AA	GACTGCGTACATGCAGAA/GATGAGTCCTGAGTAAAA
UBC 846	(CA) <sub>8</sub> GT	Pst-AA/Mse-AC	GACTGCGTACATGCAGAA/GATGAGTCCTGAGTAAAC
UBC 853	(TC) <sub>8</sub> AT	Pst-AC/Mse-AC	GACTGCGTACATGCAGAC/GATGAGTCCTGAGTAAAC
UBC 848	(CA) <sub>8</sub> GG	Pst-AC/Mse-AA	GACTGCGTACATGCAGAC/GATGAGTCCTGAGTAAAA
UBC 849	(GT) <sub>8</sub> CA	Pst-GG/Mse-GG	GACTGCGTACATGCAGGG/GATGAGTCCTGAGTAAGG
UBC 855	(AC) <sub>8</sub> CT	Pst-GG/Mse-GA	GACTGCGTACATGCAGGG/GATGAGTCCTGAGTAAGA
UBC 858	(TG) <sub>8</sub> AT	Pst-GA/Mse-GA	GACTGCGTACATGCAGGA/GATGAGTCCTGAGTAAGA
UBC 865 *	<b>(CCG)<sub>6</sub></b>	Pst-GA/Mse-GC	GACTGCGTACATGCAGGA/GATGAGTCCTGAGTAAGC
UBC 867	(GGC) <sub>6</sub>	<b>Pst-CC/Mse-CC *</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGCC/GATGAGTCCTGAGTAACC</b>
UBC 875	(CTAG) <sub>4</sub>	Pst-CC/Mse-GG	GACTGCGTACATGCAGCC/GATGAGTCCTGAGTAAGG
UBC 881	(GGGT) <sub>3</sub> G	Pst-TT/Mse-CC	GACTGCGTACATGCAGTT/GATGAGTCCTGAGTAACC

\* primery wytypowane do dalszych analiz

**Tabela 2. Sekwencje starterów AFLP wytypowanych do wstępnych analiz oceny stabilności genetycznej roślin maliny rozmnażanej *in vitro*.**

pery starterów AFLP	sekwencja (5'-3')
Pst-TC/Mse-TC	GACTGCGTACATGCAGTC/GATGAGTCCTGAGTAATC
Pst-TC/Mse-AT	GACTGCGTACATGCAGTC/GATGAGTCCTGAGTAAAT
<b>Pst-AT/Mse-AT*</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGAT/GATGAGTCCTGAGTAAAT</b>
<b>Pst-AT/Mse-TC*</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGAT/GATGAGTCCTGAGTAATC</b>
Pst-AA/Mse-AA	GACTGCGTACATGCAGAA/GATGAGTCCTGAGTAAAA
Pst-AA/Mse-AC	GACTGCGTACATGCAGAA/GATGAGTCCTGAGTAAAC
<b>Pst-AC/Mse-AC*</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGAC/GATGAGTCCTGAGTAAAC</b>
Pst-AC/Mse-AA	GACTGCGTACATGCAGAC/GATGAGTCCTGAGTAAAA
Pst-GG/Mse-GG	GACTGCGTACATGCAGGG/GATGAGTCCTGAGTAAGG
Pst-GG/Mse-GA	GACTGCGTACATGCAGGG/GATGAGTCCTGAGTAAGA
Pst-GA/Mse-GA	GACTGCGTACATGCAGGA/GATGAGTCCTGAGTAAGA
Pst-GA/Mse-GC	GACTGCGTACATGCAGGA/GATGAGTCCTGAGTAAGC
<b>Pst-CC/Mse-CC*</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGCC/GATGAGTCCTGAGTAACC</b>
<b>Pst-CC/Mse-GG*</b>	<b>GACTGCGTACATGCAGCC/GATGAGTCCTGAGTAAGG</b>
Pst-TT/Mse-CC	GACTGCGTACATGCAGATT/GATGAGTCCTGAGTAACC

\* primery wytypowane do dalszych analiz

Z 23 przetestowanych starterów ISSR zastosowanych do wstępnych analiz dla jagody kaczackiej, tylko 14 generowało powtarzalne i wyraźne produkty PCR. Startery te generowały w sumie 65 produktów amplifikacji wielkości od 400 do 2500 pz. Liczba produktów PCR dla każdego startera wahała się od 1 do 12, przy średniej wynoszącej 4,6 produktu PCR na starter ISSR. Starter UBC827 amplifikował największą, a startery UBC830 i UBC843 najmniejszą liczbę produktów PCR. Spośród testowanych starterów ISSR wybrano te, które w najwyższym stopniu różnicowały testowane odmiany. Dla jagody kaczackiej wytypowano 4 startery ISSR: UBC825, UBC865, UBC810, UBC827, które generowały polimorfizm między odmianami na poziomie odpowiednio 28,6%, 25%, 16,7% i 8,3% (Tabela 3).

Z testowanych 23 par starterów AFLP zastosowanych do wstępnych analiz dla jagody kaczackiej, 21 par starterów generowało powtarzalne i wyraźne produkty PCR. Te pary starterów generowały w sumie 574 produktów PCR wielkości od 50 do 900 pz. Liczba prążków dla każdego startera wahała się od 8 do 54, przy średniej wynoszącej 27,3 produktu PCR na parę starterów AFLP. Para starterów Pst-AG/Mse-AG amplifikowała maksymalną liczbę 54 produktów amplifikacji, a pary Pst-AC/Mse-AA i Pst-GA/Mse-GC amplifikowały najmniejszą liczbę produktów PCR. Z testowanych par starterów AFLP wybrano te, które w najwyższym stopniu różnicowały testowane odmiany. Dla jagody kaczackiej wytypowano 4 pary starterów AFLP: Pst-CC/Mse-CC, Pst-TT/Mse-CC, Pst-GC/Mse-TA i Pst-CG/Mse-AG, które generowały wysoki polimorfizm między odmianami na poziomie odpowiednio 30%, 13,3%, 11,1% i 4,8% (Tabela 3).

**Tabela 3. Wstępna analiza polimorfizmu DNA matecznych roślin jagody kamczackiej z wykorzystaniem markerów ISSR oraz AFLP.**

starter ISSR	ogólna liczba produktów amplifikacji	liczba polimorficznych produktów amplifikacji	polimorfizm (%)	pary starterów AFLP	ogólna liczba produktów amplifikacji	liczba polimorficznych produktów amplifikacji	polimorfizm (%)
UBC 806	-	-	-	Pst-TT/Mse-CC	30	4	13,3
UBC 810	6	1	16,7	Pst-GC/Mse-GC	21	0	0
UBC 813	-	-	-	Pst-GC/Mse-TA	18	2	11,1
UBC 821	-	-	-	Pst-TA/Mse-TA	14	0	0
UBC 822	9	0	0	Pst-TA/Mse-GC	42	0	0
UBC 823	5	0	0	Pst-AG/Mse-AG	54	0	0
UBC 825	7	2	28,6	Pst-AG/Mse-CG	36	0	0
UBC 827	12	1	8,3	Pst-CG/Mse-AG	42	2	4,8
UBC 828	2	0	0	Pst-TC/Mse-TC	13	0	0
UBC 830	1	0	0	Pst-TC/Mse-AT	20	0	0
UBC 834	3	0	0	Pst-AT/Mse-AT	50	0	0
UBC 840	2	0	0	Pst-AT/Mse-TC	25	0	0
UBC 843	1	0	0	Pst-AA/Mse-AA	13	0	0
UBC 846	3	0	0	Pst-AA/Mse-AC	37	0	0
UBC 853	6	0	0	Pst-AC/Mse-AC	12	0	0
UBC 848	-	-	-	Pst-AC/Mse-AA	8	0	0
UBC 849	-	-	-	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-
UBC 855	4	0	0	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-
UBC 858	-	-	-	Pst-GA/Mse-GA	19	0	0
UBC 865	4	1	25,0	Pst-GA/Mse-GC	9	0	0
UBC 867	-	-	-	Pst-CC/Mse-CC	20	6	30,0
UBC 875	-	-	-	Pst-CC/Mse-GG	43	0	0
UBC 881	-	-	-	Pst-TT/Mse-CC	48	0	0

Z testowanych 15 par starterów AFLP zastosowanych do wstępnych analiz dla maliny, 12 par starterów generowało powtarzalne i wyraźne produkty PCR. Te pary starterów generowały w sumie 324 produkty PCR wielkości od 50 do 500 pz. Liczba prążków dla każdego startera wahała się od 7 do 48, przy średniej wynoszącej 27 produktów PCR na parę starterów AFLP. Para starterów Pst-AA/Mse-AC amplifikowała maksymalną liczbę 48 produktów amplifikacji, a pary Pst-TC/Mse-AT, Pst-TC/Mse-TC i Pst-GA/Mse-GC amplifikowały najmniejszą liczbę produktów PCR. Z testowanych par starterów AFLP wybrano te, które w najwyższym stopniu różnicowały testowane odmiany. Dla maliny wytypowano 5 par AFLP: Pst-CC/Mse-CC, Pst-CC/Mse-GG, Pst-AC/Mse-AC, Pst-AT/Mse-AT oraz Pst-AT/Mse-TC, które generowały wysoki polimorfizm między odmianami na poziomie odpowiednio 21,7%, 17,0%, 10,7%, 10,0% oraz 8,0%. (Tabela 4).

**Tabela 4. Wstępna analiza polimorfizmu DNA matecznych roślin maliny z wykorzystaniem markerów AFLP.**

pery starterów AFLP	ogólna liczba produktów amplifikacji	liczba polimorficznych produktów amplifikacji	polimorfizm (%)
Pst-TC/Mse-TC	7	0	0
Pst-TC/Mse-AT	9	0	0
Pst-AT/Mse-AT	20	2	10,0
Pst-AT/Mse-TC	25	2	8,0
Pst-AA/Mse-AA	29	0	0
Pst-AA/Mse-AC	48	3	6,25
Pst-AC/Mse-AC	28	3	10,7
Pst-AC/Mse-AA	19	0	0
Pst-GG/Mse-GG	-	-	-
Pst-GG/Mse-GA	-	-	-
Pst-GA/Mse-GA	40	0	0
Pst-GA/Mse-GC	6	0	0
Pst-CC/Mse-CC	46	10	21,7
Pst-CC/Mse-GG	47	8	17,0
Pst-TT/Mse-CC	-	-	-

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas analiz zostały wytypowane zestawy markerów ISSR-PCR oraz AFLP, przy pomocy których można zidentyfikować badane odmiany jagody kamczackiej oraz maliny (Tabela 5). Markery te zostały wykorzystane do analizy stabilności genetycznej roślin uzyskanych na drodze rozmnażania *in vitro*.

**Tabela 5. Startery ISSR i AFLP wytypowane do oceny stabilności genetycznej roślin jagody kamczackiej oraz maliny rozmnażanych *in vitro*.**

	Gatunek	
	malina	jagoda kamczacka
<b>Startery ISSR</b>	-	825 810 827 865
<b>Startery AFLP</b>	Pst-AT/Mse-AT Pst-AT/Mse-TC Pst-AC/Mse-AC Pst-CC/Mse-CC Pst-CC/Mse-GG	Pst-CC/Mse-CC Pst-TT/Mse-CC Pst-GC/Mse-TA Pst-CG/Mse-AG

### 3.2. Stabilność genetyczna maliny odmiany ‘Polka’ oraz ‘Polana’.

Przeprowadzono ocenę tożsamości genetycznej roślin pochodzących z kultur *in vitro* oraz roślin matecznych dwóch odmian maliny: ‘Polana’ i ‘Polka’. Materiał roślinny stanowiły liście zebrane z 10 klonów *in vitro* rosnących w szklarni oraz 3 roślin matecznych każdej z odmian (standard). Genomowy

DNA do analiz wyizolowano w dwóch powtórzeniach, przy pomocy komercyjnego zestawu do izolacji DNA Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.) według instrukcji podanej przez producenta. Analizy AFLP-PCR przeprowadzono z 5 parami starterów: Pst-AT/Mse-AT, Pst-AT/Mse-TC, Pst-AC/Mse-AC, Pst-CC/Mse-CC i Pst-CC/Mse-GG wg metodyki opisanej przez Vos i wsp. (1995).

Analiza AFLP wykazała występowanie polimorfizmu na poziomie DNA w roślinach pochodzących z kultur *in vitro* maliny, który wyniósł 0,49% u odmiany ‘Polana’ i 2,73% w przypadku odmiany ‘Polka’. Szczegółową analizę markerów AFLP przedstawiono w Tabeli 6.

Stożenie zmienności somaklonalnej generowanej przez kultury *in vitro* różnił się w zależności od badanej odmiany. W przypadku maliny odmiana ‘Polana’ charakteryzuje się wyższą stabilnością genetyczną niż odmiana ‘Polka’.

**Tabela 6. Analiza markerów AFLP w roślinach maliny odmian ‘Polana’ i ‘Polka’ pochodzących z kultur *in vitro* w odniesieniu do roślin matecznych.**

startery AFLP	liczba produktów amplifikacji	
	ogółem	polimorficzne
<b>Polana</b>		
Pst-CC/Mse-CC	70	0
Pst-CC/Mse-GG	76	0
Pst-AT/Mse-AT	108	0
Pst-AT/Mse-TC	89	0
Pst-AC/Mse-AC	65	2
<b>suma</b>	<b>408</b>	<b>2</b>
<b>polimorfizm (%)</b>	<b>0,49</b>	
<b>Polka</b>		
Pst-CC/Mse-CC	78	3
Pst-CC/Mse-GG	93	0
Pst-AT/Mse-AT	106	1
Pst-AT/Mse-TC	92	4
Pst-AC/Mse-AC	69	4
<b>suma</b>	<b>438</b>	<b>12</b>
<b>polimorfizm (%)</b>	<b>2,74</b>	

### 3.3. Stabilność genetyczna jagody kamiczackiej odmiany ‘Wojtek’ oraz ‘Zojka’.

Badano zmienność genetyczną dwóch odmian jagody kamiczackiej: ‘Zojka’ oraz ‘Wojtek’ podczas uprawy szklarniowej. Materiał do analiz pobrano z 15 losowo wytypowanych roślin z każdej odmiany rozmnożonych *in vitro*. Genomowy DNA izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta w ilości 2 powtórzeń dla każdej próby. Przygotowane preparaty genomowego DNA służyły jako matryca do przeprowadzenia reakcji PCR z użyciem 4 par starterów AFLP: Pst-CC/Mse-CC, Pst-TT/Mse-CC, Pst-GC/Mse-TA, Pst-



CG/Mse-AG wg metodyki opisanej przez Vos i wsp. (1995) oraz 4 starterów ISSR: UBC825, UBC810, UBC827 i UBC865.

W drugim sezonie uprawy roślin jagody kamczackiej rozmnożonych *in vitro* w warunkach szklarniowych, markery ISSR generowały łącznie 40 i 36 produktów amplifikacji o wielkości od 300 do 1400 pz, odpowiednio dla roślin odmiany 'Wojtek' i 'Zojka'. Pary starterów AFLP generowały łącznie 102 i 105 produktów amplifikacji o wielkości od 50 do 900 pz, odpowiednio dla roślin odmiany 'Wojtek' i 'Zojka'.

U roślin odmiany 'Wojtek' podczas analiz markerów ISSR nie obserwowano zjawiska zmienności genetycznej w porównaniu z roślinami kontrolnymi, matecznymi. Natomiast w przypadku roślin odmiany 'Zojka' średni stopień zmienności genetycznej wynosił 2,8% (Tabela 7). W porównaniu z roślinami matecznymi na podstawie analiz markerów AFLP obserwowano, że rośliny jagody kamczackiej odmiany 'Wojtek' wykazywały zmienność genetyczną na poziomie poniżej 1%, natomiast u roślin odmiany 'Zojka' zmienność ta na etapie uprawy szklarniowej wynosiła 1,9% (Tabela 8).

Podsumowując wyniki analiz dotyczących zmienności genetycznej u roślin jagody kamczackiej pochodzących z mikrorozmnażania wnioskować można, że odmiana 'Wojtek' charakteryzuje się wyższą stabilnością genetyczną (średnia zmienność na poziomie 0,49%) niż odmiana 'Zojka' (średnia zmienność genetyczna na poziomie 2,3%).

**Tabela 7. Analiza markerów ISSR dla roślin jagody kamczackiej pochodzących z mikrorozmnażania podczas uprawy w warunkach szklarniowych w odniesieniu do roślin matecznych.**

startery ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji	
		ogółem	polimorficzne
<b>Zojka</b>			
825	500 - 1000	9	1
810	600 - 1300	6	0
827	300 - 800	12	0
865	300 - 1400	9	0
<b>suma</b>		<b>36</b>	<b>1</b>
<b>polimorfizm (%)</b>		<b>2,77</b>	
<b>Wojtek</b>			
825	400 - 1000	11	0
810	500 - 1300	5	0
827	300 - 750	11	0
865	300 - 1400	13	0
<b>suma</b>		<b>40</b>	<b>0</b>
<b>polimorfizm (%)</b>		<b>0,0</b>	

**Tabela 8. Analiza markerów AFLP dla roślin jagody kamczackiej pochodzących z mikrorozmnażania podczas uprawy w warunkach szklarniowych w odniesieniu do roślin matecznych.**

startery AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji	
		ogółem	polimorficzne
<b>Zojka</b>			
Pst-CC/Mse-CC	300-80	19	1
Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	1
Pst-GC/Mse-TA	850-300	18	0
Pst-CG/Mse-AG	760-200	42	0
<b>suma</b>		<b>105</b>	<b>2</b>
<b>polimorfizm (%)</b>		<b>1,9</b>	
<b>Wojtek</b>			
Pst-CC/Mse-CC	300-50	16	1
Pst-TT/Mse-CC	900-250	30	0
Pst-GC/Mse-TA	850-400	16	0
Pst-CG/Mse-AG	750-200	40	0
<b>suma</b>		<b>102</b>	<b>1</b>
<b>polimorfizm (%)</b>		<b>0,98</b>	

#### 4. Podsumowanie

Kontrola jakości produkowanego materiału nasadzeniowego pod względem stabilności genetycznej jest istotna dla zapewnienia pożądanej jakości materiału roślinnego, który jest wprowadzany do uprawy, ponadto umożliwia identyfikację odmian i eliminację ewentualnych mutacji na wszystkich etapach rozmnażania roślin *in vitro* oraz podczas wzrostu *ex vitro*. Wykorzystanie markerów molekularnych daje możliwość wykrywania zmian na poziomie DNA, nie ujawniających się fenotypowo. Wysoka powtarzalność wyników i łatwość aplikacji decyduje o ich wysokim stopniu użyteczności.

Opracowane metody badania zmienności genetycznej roślin pochodzących z mikrorozmnażania maliny i jagody kamczackiej mogą być zastosowane w ośrodkach zajmujących się produkcją elitarnego materiału roślin ogrodnictwa.

Analiza markerów ISSR oraz AFLP wykazała, że zastosowana metoda rozmnażania *in vitro* maliny i jagody kamczackiej skutkuje otrzymaniem roślin w wysokim stopniu jednorodnych genetycznie.

#### 5. Literatura

- Arnau G., Lallemand J., Bourgoin M. 2003. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simplesequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129: 69.
- Butiuc-Keul A., Farkasi A., Cristea V. 2016. Genetic Stability Assessment of *in vitro* Plants by Molecular Markers. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia*, LXI (1): 107-114.
- Cloutier S., Landry B.S. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 30(1): 32-39.

- Deepthi V.P. 2018. Somaclonal variation in micro propagated bananas. *Adv Plants Agric Res.* 8(6): 624-627.
- Evans D.A, Bravo J.E. 1986. Phenotypic and Genotypic Stability of Tissue Cultured Plants. In: Zimmerman R.H., Griesbach R.J., Hammerschlag F.A., Lawson R.H. (eds) *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 2*: 73-94.
- Gostimsky S.A., Kokaeva Z.G., Konovalov F.A. 2005. Studying plant genome variation using molecular markers. *Russ. J. Genet.* 41: 378-388.
- Hammerschlag F.A. 1992. Somaclonal variation. In: Hammerschlag, Litz, editors. *Biotechnology of perennial fruits*. Wallingford: CAB International, 35-55.
- Martins M., Sarmiento D., Oliveira M. 2005. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 23(7): 492-496.
- Mohan Jain S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>
- Phillips R.L., Kaepplert S.M., Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5222–5226.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54, 2-3: 227-239.
- Zenkteler M., Zenkteler E. 2013. 65 years of *in vitro* culture in Poland. *Acta Soc Bot Pol* 82(3):183–192.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 11, 4407-4414.