

Metody oceny wierności genetycznej roślin rozmnażanych w kulturach *in vitro* z zastosowaniem analizy cytogenetycznej oraz metod molekularnych

Evaluation of genetic fidelity of in vitro propagated plants applying cytogenetic analysis and molecular methods

Natalia Turowska, Małgorzata Kikowska, Barbara Thiem

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Konwencjonalne rozmnażanie szeregu gatunków roślin leczniczych z różnych przyczyn jest nieefektywne lub niemożliwe. W wyniku odpowiednio dobranej metody klonalnego rozmnażania *in vitro*, w stosunkowo krótkim czasie, można otrzymać dużą liczbę genetycznie jednorodnych roślin potomnych, stanowiących źródło wartościowego, homogennego surowca leczniczego. Mikro-rozmnażanie jest metodą rozmnażania wegetatywnego w kulturze *in vitro*, wykorzystywaną do masowego mnożenia roślin na skalę produkcyjną. Rośliny potomne powinny być zgodne ze wzorcem gatunkowym, charakteryzować się jednorodnością pod względem zarówno morfologicznym, fitochemicznym, jak i genetycznym w stosunku do wyselekcjonowanej rośliny donorowej. Opracowywane protokoły efektywnego rozmnażania *in vitro* roślin mają na celu otrzymanie wysokiej jakości mikrosadzonek, które przeniesione do gruntu, po osiągnięciu stadium dojrzałości, będą źródłem standaryzowanego surowca. Warunki kultury *in vitro* w namnażanym materiale roślinnym mogą wywołać tzw. zmienność somaklonalną, dlatego konieczne jest monitorowanie stabilności kultur. Jednym z podstawowych kryteriów oceny jest analiza stabilności genetycznej uzyskanych klonów, którą można przeprowadzić techniką cytometrii przepływowej oraz za pomocą markerów molekularnych. Celem pracy jest przedstawienie metod najczęściej stosowanych do oceny genetycznej stabilności roślin otrzymywanych za pomocą różnych technik klonalnego rozmnażania *in vitro*. (*Farm Współ* 2020; 13: 150-158)

Słowa kluczowe: roślinne kultury tkankowe, stabilność genetyczna, zmienność somaklonalna, metody molekularne

Abstract

Conventional reproduction of a number of medicinal plant species is ineffective or impossible for different reasons. As a result of an appropriately selected method of clonal reproduction *in vitro*, a large number of genetically homogeneous progeny plants can be obtained in a relatively short time. Those plants are a source of valuable, homogeneous medicinal raw material. Micropropagation is a method of vegetative reproduction in *in vitro* culture, used for the mass multiplication of plants on a production scale. The progeny plants should be consistent across species group and characterized by morphological, phytochemical and genetic homogeneity in relation to the selected donor plant. The developed protocols for effective *in vitro* reproduction of plants are aimed at obtaining high-quality micro-seedlings which, when transferred to the ground, after reaching the maturity stage, will be a source of standardized raw material. As the conditions of *in vitro* culture in the propagated plant material may trigger the so-called somaclonal variation, therefore it is necessary to monitor the stability of the cultures. One of the basic evaluation criteria is the analysis of the genetic stability of the obtained clones, which can be performed by flow cytometry and with the use of molecular markers. The aim of the study is to show the most applicable methods of genetic fidelity evaluation of plants regenerated *via* varied clonal propagation technique. (*Farm Współ* 2020; 13: 150-158)

Keywords: plant tissue cultures, genetic stability, somaclonal variation, molecular methods

Wstęp

Od szeregu lat wzrasta zainteresowanie lekiem roślinnym, co zwiększa zapotrzebowanie na substancje roślinne wykorzystywane przez przemysł farmaceutyczny, spożywczy i kosmetyczny. Rozmnażanie wegetatywne roślin w kulturze *in vitro* określane jest jako mikrorozmnażanie (ang. *micropropagation*, *clonal propagation*, *rapid clonal propagation*, *in vitro propagation*), celem którego jest otrzymanie dużej liczby wyrównanych genetycznie roślin, namnożenie identycznych, cennych genotypów, wykorzystywanych do przemysłowej produkcji ważnych metabolitów wtórnych. Obecnie stanowi obszerną gałąź produkcji roślinnej, dynamicznie rozwijającego się przemysłu *in vitro*, stwarzającego możliwość masowego rozmnażania ważnych gospodarczo gatunków roślin ozdobnych, drzew, warzyw, a także roślin leczniczych [1-3]. Metoda pozwala w kulturach *in vitro* uzyskać z małych fragmentów roślin wysoki wskaźnik rozmnażania, w stosunkowo krótkim czasie. Materiał roślinny otrzymywany za pomocą różnych metod rozmnażania *in vitro* stanowi alternatywę dla pozyskiwania surowców z roślin rosnących w warunkach naturalnych bądź produkcji w uprawach polowych [1]. W świetle zaleceń ESCOP (ang. *European Scientific Cooperation for Phytotherapy*) i komisji farmakopealnych mikrosadzonki roślin leczniczych powinny być wytwarzane zgodnie z wymogami Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP i GAP) [2,4,5]. Wysoką jakość przyszłego surowca farmaceutycznego zapewniają prawidłowo opracowane wydajne systemy mikropropagacji, które umożliwiają namnożenie jednorodnych roślin, o jednakowym fenotypie z wyselekcjonowanych, elitarnych genotypów, charakteryzujących się wysoką zawartością związków o działaniu farmakologicznym. Jednak warunki kultury *in vitro* mogą wywołać zmienność somaklonalną w namnażanym materiale roślinnym, dlatego konieczne jest monitorowanie stabilności uzyskanych roślin. Wegetatywne rozmnażanie roślin, jakie zachodzi w kulturach *in vitro*, a także ściśle kontrolowane warunki hodowli, teoretycznie nie powinny powodować zmienności w obrębie powstających klonów. W procesie mikrorozmnażania regeneracja roślin oparta jest na podziałach mitotycznych somatycznych komórek, dlatego rośliny potomne powinny być identyczne z rośliną donorową, z której pobrano eksplantat. Liczne badania wskazują jednak, że niezależnie od zastosowanej metody mikrorozmnażania istnieje ryzyko pojawienia się w zregenerowanych roślinach

zmienności somaklonalnej, czyli spontanicznej zmienności obserwowanej u roślin potomnych uzyskanych w kulturach *in vitro* z tej samej rodzicielskiej linii komórek. Może ona dotyczyć różnic fenotypowych, cytomorfologicznych i fizjologicznych, głównie jednak posiada podłoże genetyczne [6]. Wizualna ocena uzyskanych regenerantów jest niewystarczająca. W trakcie trwania kultury *in vitro* może wystąpić zmienność spontaniczna, wówczas regenerujące rośliny wykazują odmienne cechy fenotypowe lub, co bardziej niewskazane, odmienne cechy biochemiczne, różniące je od rośliny donorowej [3,7].

Metody klonalnego rozmnażania roślin *in vitro*

Roślinne kultury *in vitro* oparte są na specyficznej właściwości komórek roślinnych, które wykazują zdolność do nieograniczonego dzielenia się i różnicowania we wszystkie typy komórek. Totipotencja komórek roślinnych pozwala na odtworzenie całej rośliny w procesie organogenezy [8]. Organogeneza zachodząca podczas rozmnażania klonalnego roślin w kulturach *in vitro* jest uzależniona od szeregu czynników: pochodzenia i stopnia zróżnicowania eksplantatu, obecności w podłożu hodowlanym regulatorów wzrostu i rozwoju (fitohormonów), a także warunków prowadzenia hodowli. Sygnał hormonalny docierający do rośliny inicjuje dedyferencjację komórek, które nabywają kompetencji do wznowienia podziałów komórkowych. Formowane są centra merystematyczne i następuje tworzenie organów, bądź powstają one z istniejących już w eksplantacie merystemów wierzchołkowych lub kątowych [8].

Mikrorozmnażanie, szeroko wykorzystywana technika w biotechnologii roślin, polega głównie na pobudzaniu do rozwoju merystemów bocznych, bądź indukcji *de novo* organów przybyszowych. Zaletą propagacji roślin leczniczych z wykorzystaniem różnych typów kultury *in vitro*, jest możliwość szybkiego namnożenia z pojedynczej, elitarniej rośliny donorowej o wysokiej wartości jednostkowej, dużej liczby roślin potomnych o tych samych cechach. Wyselekcjonowane wartościowe genotypy i klony roślin o wysokiej zawartości pożądaných metabolitów wtórnych stanowią źródło eksplantatów do zainicjowania procesu mikrorozmnażania. Propagacja roślin w warunkach *in vitro* oparta jest na zdolności eksplantatów do masowego formowania pąków bocznych, przybyszowych, mikrocebulek i zarodków somatycznych [8]. Tym samym

metoda ta w warunkach *in vitro* może być zapoczątkowana przez pobudzenie do rozwoju pąków bocznych, tworzenie pąków przybyszowych bezpośrednio lub pośrednio przez kalus oraz embriogenezę somatyczną. Jest więc procesem kilkietapowym, a namnożone i rozwinięte pędy wymagają ukorzenia w warunkach *in vitro* lub *ex vitro* [1,8,9].

Najbardziej zalecaną metodą rozmnażania roślin leczniczych jest pobudzenie do rozwoju pąków pachwinowych z wierzchołków pędów lub fragmentów pędów z węzłem, tzw. **kultury pąków bocznych** [10]. Pożywki uzupełniane cytokininą niwelują hamujące działanie endogennej auksyny (odpowiedzialnej za dominację wierzchołkową) i powodują rozwój pąków kątowych z już istniejących zawiązków i tworzenie nowych, co pozwala na „rozkrzewianie” i otrzymanie tzw. wielopędów [9]. Kultury pędów bocznych cechują się najwyższą stabilnością genetyczną uzyskanych roślin potomnych, gdyż kontynuują rozwój, jaki został im nadany jeszcze w środowisku naturalnym [8].

Bardzo efektywną metodą rozmnażania klonalnego są **kultury pąków przybyszowych**, w których bezpośrednio bądź pośrednio w tkankach eksplantatu pierwotnego utworzone zostają na nowo pąki przybyszowe [11]. Mogą one powstawać bez pośrednictwa kalusa, na drodze tzw. **organogenezy bezpośredniej**, co inicjowane jest wyłożeniem wyizolowanego fragmentu organu rośliny (eksplantatu) – liścia, korzenia czy łodygi na podłoże z dodatkiem odpowiednich fitohormonów. Stymuluje to odróżnicowanie się żywych komórek eksplantatu, które w wyniku ciągłych podziałów tworzą centra merystematyczne, będące zawiązkami wierzchołków pędów lub korzeni. W metodzie różnicowania się pąków przybyszowych bezpośrednio z tkanek eksplantatu uzyskane rośliny zachowują genotyp rośliny donorowej, ale wadą metody jest jej przydatność w rozmnażaniu niewielu gatunków [8,12]. Natomiast różnicowanie się pąków przybyszowych w drodze **organogenezy pośredniej** możliwe jest u wszystkich gatunków roślin, z dowolnego eksplantatu. Wzbogacenie pożywki w auksyny i cytokiny indukuje odróżnicowanie się żywych komórek eksplantatu, z których w wyniku intensywnych podziałów formowany jest kalus. Niektóre jego komórki po licznych podziałach zaczynają się na nowo różnicować i w procesie organogenezy formować organy rośliny. Wadą tej szybkiej i wydajnej metody jest ryzyko, że pędy indukowane z kalusa mogą mieć zmienioną podstawową liczbę chromosomów, posia-

dać komórki o różnej ploidalności lub być chimerami [13]. Rośliny potomne otrzymane tą metodą wymagają szczególnego monitorowania, ponieważ pąki zregenerowane z kalusa nie gwarantują utrzymania stabilności genetycznej mnożonego materiału roślinnego [14]. Kultury oparte na formowaniu pędów przybyszowych są wykorzystywane do rozmnażania gatunków, które mają ograniczone zdolności do wytwarzania pąków bocznych [3,9].

Inną formą szybkiego i bardzo efektywnego rozmnażania wegetatywnego jest **embriogeneza somatyczna**. Jest to proces biologiczny, w którym w warunkach *in vitro* tworzą się zarodki z komórek wegetatywnych. Proces embriogenezy jest indukowany przez określone czynniki, tj. warunki prowadzenia hodowli, skład podłoża oraz wybór eksplantatu. Embriogeneza może przebiegać bezpośrednio na tkankach eksplantatu (głównie w przypadku młodych tkanek) bądź mieć charakter pośredni, z wytworzeniem embriogenego kalusa na eksplantacie pierwotnym. Zarodki somatyczne cechuje dwubiegunowość, która w dalszym rozwoju uwidacznia podział na zawiązki pędu i korzenia. W efekcie embriogenezy somatycznej otrzymuje się liczne nowe kompletne rośliny [8,12]. Rośliny otrzymane z zarodków somatycznych zachowują na ogół genotyp rośliny donorowej [15].

Wpływ warunków kultury *in vitro* na zmienność somaklonalną rozmnażanych roślin

Rośliny otrzymywane drogą rozmnażania klonalnego *in vitro* narażone są na szereg czynników stresowych, wynikających z warunków kultury. Zauważono, że podczas trwania kultury *in vitro*, m.in. w procesie mikro-rozmnażania, może być zachowana stabilność genetyczna uzyskanych roślin potomnych lub sporadycznie może pojawić się w kulturach spontaniczna zmienność, tzw. zmienność somaklonalna [6,16]. Zmiany w zregenerowanych roślinach, inne cechy niż w wyjściowym materiale rodzicielskim, mogą wystąpić okresowo lub pozostać na trwałe. W procesie mikro-rozmnażania zmienność somaklonalna stanowi niepożądane zjawisko, które występuje często podczas różnicowania kalusa i formowaniu pąków przybyszowych. Kontrola stabilności genetycznej roślin jest ważnym elementem mikro-rozmnażania roślin, ponieważ bez względu na dalsze przeznaczenie, mikrosadzonki powinny posiadać wysoką jakość i być tożsame z rośliną donorową. Wierność fenotypowa i wierność

genetyczna przesądza o wartości użytkowej rozmnażanych roślin. Zmienność może objawiać na poziomie fenotypu, ploidalności, sekwencji DNA i/lub aktywności metabolicznej. Występująca zmienność zwykle jest wykrywana na poziomie genetycznym (sekwencji DNA) lub epigenetycznym (metylacji cytozyny) [14].

Nieodpowiednio dobrane warunki kultur *in vitro* oraz ich przechowywania narażają kultury roślinne na działanie stresu chemicznego, fizycznego i fizjologicznego, co może prowadzić do wystąpienia w roślinach potomnych różnych zmian na poziomie fenotypowym (zmiany morfologiczne), biochemicznym (zmiany zawartości metabolitów) i genetycznym. Ocena za pomocą markerów fenotypowych, biochemicznych, cytogenetycznych i genetycznych mikrosadzonek roślin leczniczych jest szczególnie konieczna do określenia wartości przyszłego surowca farmaceutycznego [2].

Zmienność genetyczna wśród roślin potomnych powinna być oceniona pod kątem takich parametrów jak: charakter zmienności, częstotliwość jej występowania oraz czynników mających na nią wpływ, a także możliwości zredukowania bądź całkowitego jej wyeliminowania [17]. Kontrolowanie tych parametrów ma znaczący wpływ na pozyskanie wysokiej jakości surowca. Wiąże się z opracowaniem precyzyjnych protokołów mikrorozmnażania, umożliwiających otrzymanie jednorodnych roślin zgodnych z materiałem wyjściowym [2].

Czynnikami wpływającymi na zmienność somaklonalną występującą podczas mikrorozmnażania są głównie wybór eksplantatu i genotyp rośliny donorowej, wybór metody rozmnażania, warunki prowadzenia kultury, obecność i stężenie regulatorów wzrostu w pożywce oraz długość trwania kultury [7].

Zmiany genetyczne zachodzące w materiale w kulturach *in vitro* mogą dotyczyć kariotypu – liczby chromosomów (aneuploidyzacja, poliploidyzacja) lub ich struktury (aberracje strukturalne) ale również mutacji pojedynczych genów. Badania stabilności genetycznej najczęściej prowadzone są z zastosowaniem markerów molekularnych, które jednak nie wykrywają zmian w poliploidalności. Wyniki analizy molekularnej, uzupełniane badaniami morfologicznymi, cytologicznymi i cytometrycznymi mogą przedstawić pełen obraz zgodności roślin potomnych z cechami rośliny donorowej [14].

Analizy kariotypu są obecnie rzadko stosowane ze względu na trudności w przygotowywaniu preparatów

oraz dużą liczbę i małe rozmiary chromosomów występujących u wielu gatunków roślin [14,18]. Natomiast analizy cytogenetyczne z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej są często wykorzystywane do oceny ploidalności i zawartości jądrowego DNA roślin rozmnażanych w kulturze *in vitro* [18,19].

W kulturach *in vitro* może wystąpić także zmienność epigenetyczna, polegająca na zmianie wzorów metylacji DNA. Stwierdzono, że zmiany poziomu metylacji mogą częściowo ulec odwróceniu w trakcie kolejnych cykli pasażu [11].

Preferowaną metodą mikrorozmnażania, pozwalającą na całkowite wyeliminowanie lub zredukowanie niestabilności genetycznej uzyskanych roślin potomnych, jest pobudzanie rozwoju istniejących już w eksplantacie pąków [6,7]. Najwyższe ryzyko zaburzenia tej stabilności jest możliwe w przypadku regeneracji roślin metodą tworzenia pąków przybyszowych *de novo* z kalusa [6,7]. Wiadomo, że organy roślinne regenerujące przez kalus nie gwarantują zachowania stabilności genetycznej. Mutacje genetyczne mogą objawiać się w zmianie liczby chromosomów, występowaniu aberracji chromosomowych oraz poliploidalności, która jest także uzależniona od stresu oksydacyjnego jakiemu poddawane są eksplantaty [3,6,7]. Ponadto czynnikami stresowymi indukującymi zmiany w obrębie genomu są nienaturalne warunki wzrostu działające na eksplantat: skład podłoża hodowlanego oraz dodatek wysokich stężeń regulatorów wzrostu i rozwoju – auksyn (szczególnie kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego) i cytokinin. Wzrost niestabilności genetycznej pojawia się także wraz z upływem czasu prowadzenia hodowli [14,20,21]. Zmiany genetyczne, jakie zachodzą w DNA podczas mikrorozmnażania mogą być spowodowane spontanicznymi mutacjami – wówczas są dziedziczne, bądź epigenetyczną kontrolą ekspresji genów. Można ją zdefiniować jako dziedziczną zmianę w ekspresji genów, która jest potencjalnie odwracalna i nie jest spowodowana modyfikacją sekwencji. Epigenetyczne aspekty zmienności somaklonalnej obejmowałyby zatem mechanizmy wyciszania genów lub aktywacji genów, które nie byłyby spowodowane aberracjami chromosomowymi lub zmianą sekwencji [22].

Metody badania zmienności somaklonalnej w rozmnażanych *in vitro* roślinach

Wykrywanie zmienności somaklonalnej wśród zregenerowanych roślin jest koniecznym etapem

mikrorozmnażania roślin leczniczych, pozwalającym na eliminowanie roślin wykazujących niepożądane zmiany [12]. W celu detekcji zmienności wykorzystywane są metody morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne, cytogenetyczne i molekularne [7]. Obecnie w celu oceny stabilności zregenerowanych roślin i wykrywania niezamierzonej zmienności somaklonalnej najczęściej stosuje się metody cytogenetyczne i molekularne. Zaliczane są do nich analizy: ploidalności z wykorzystaniem technik cytogenetycznych (badanie kariotypu lub metoda cytometrii przepływowej), białek i izozymów, metoda RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) oraz technika łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*; PCR).

Cytometria przepływowa

Stabilność cytogenetyczna roślin pochodzących z kultur *in vitro* bardzo często może zostać zaburzona a pojawiająca się zmienność może być związana z wielkością genomu i wynikać ze zmian liczby pojedynczych chromosomów lub ze zmiany ploidalności [16,23]. Ilościowe i jakościowe modyfikacje w sekwencji DNA mogą prowadzić do różnicy w liczbie chromosomów [14]. Technika, która znalazła szerokie zastosowanie w badaniach wielkości genomu jest cytometria przepływowa, wykorzystywana także w badaniach genetycznej stabilności roślin rozmnażanych w kulturze *in vitro* [13,18,20,21,24]. Analizy metodą cytometrii przepływowej polegają na pomiarze intensywności promieniowania fluorescencyjnego jąder komórkowych, które zostały wyizolowane, wybarwione barwnikiem fluorochromowym i umieszczone w strumieniu cieczy [23]. Jest to szybka, tania, prosta a jednocześnie precyzyjna metoda pomiaru zawartości jądrowego DNA w komórkach, oznaczania stopnia ploidalności oraz określania faz cyklu komórkowego oparta na istniejącej liniowej zależności między intensywnością fluorescencji emitowanej przez wybarwione DNA, a jego ilością w jądrze [23]. W pracach poświęconych mikrorozmnażaniu często stosowana jest do oceny stabilności genomu i ploidalności otrzymanych *in vitro* regenerantów, jednakże nie pozwala na wykrycie zmian w sekwencji DNA [14,18]. Liczne badania analizy metodą cytometrii przepływowej wykazały, że dobrze opracowane warunki kultur *in vitro* w procesie mikrorozmnażania różnych gatunków roślin leczniczych nie wpływają na wielkość genomów badanych taksonów [20,21,25].

Metody molekularne stosowane do detekcji zmienności genetycznej roślin rozmnażanych *in vitro*

Efektywnym narzędziem do oceny stabilności genetycznej zregenerowanych roślin są markery molekularne, które są znacznikami niezależnymi od czynników środowiskowych i generują wiarygodne oraz powtarzalne wyniki. Markery molekularne wykorzystywane są w celu potwierdzenia genetycznej homogenności uzyskanych w kulturze *in vitro* regenerantów [12]. Stosowane są także podczas identyfikacji różnorodności genetycznej, geograficznej oraz relacji filogenetycznych, weryfikacji autentyczności gatunku oraz mapowaniu genetycznym roślin leczniczych [26].

Markerem molekularnym określamy zmianę, jaka zachodzi w obrębie sekwencji DNA na skutek zamiany pojedynczego nukleotydu, rzadziej insercji lub delecji. Techniki molekularne bazujące na takich znacznikach mogą opierać się na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych – technika RFLP, bądź reakcji PCR, która pozwala na zidentyfikowanie nielocalizowanych wcześniej zmian w obrębie sekwencji DNA. W związku z tym największe znaczenie wśród metod analizy DNA roślin uzyskanych w kulturach *in vitro* posiadają metody oparte na reakcji PCR. Są to najczęściej techniki AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów), RAPD (ang. *Randomly Amplified Polymorphic DNA* – metoda losowej amplifikacji polimorficznego DNA) oraz ISSR (ang. *Inter Simple Sequence Repeat* – polimorfizm odcinków DNA pomiędzy mikrosatelitami) [27,28].

Analizy RAPD i ISSR są oparte na niekodujących regionach DNA, które służą do wykrycia różnic stabilności genetycznej [29]. Stosowanie metody RAPD rekomenduje się jako pierwszą z wyboru, wówczas gdy nie ma pewności czy wystąpiła zmienność genetyczna. Jeśli polimorfizm zostanie wykryty, wówczas znajdują zastosowanie bardziej szczegółowe markery molekularne, najczęściej ISSR. Ponadto metoda RAPD pozwala na objęcie analizą całego genomu, podczas gdy technika ISSR tylko określone jego regiony [29,30,31,32]. Jednakże istotnym ograniczeniem obu metod są koszty związane z zaprojektowaniem i nabyciem dużej puli odpowiednich starterów [33,34].

Metoda RAPD jest szybką, wysoce zautomatyzowaną techniką wymagającą niewielkiej ilości DNA oraz pozwalającą na analizę dużej liczby próbek w tym samym czasie. Analizy te są najczęściej stosowane przez

badaczy potwierdzających jednorodność genetyczną uzyskanych *in vitro* mikrosadzonek [26,30,32,35]. Metoda zakłada wprowadzenie do reakcji PCR losowo dobranego startera o zawartości od 50-80% zasad G (guanina) i C (cytozyna) o długości od kilku do kilkunastu nukleotydów, który dołącza się komplementarnie do sekwencji genomowego DNA. W efekcie rozdziału produktów amplifikacji otrzymuje się charakterystyczny dla każdej analizowanej próbki układ prążków – fragmentów o różnej wielkości, który porównany z układem prążków rośliny donorowej daje odpowiedź czy wystąpiła zmienność. Wyniki uzyskane metodą RAPD często nie są jednoznacznie odtwarzalne, ponieważ bardzo często zależą od zaprogramowanych warunków termicznych reakcji, a także stężenia użytych starterów, czystości matrycy DNA oraz jakości użytego termocyklera [27,28].

Technika RAPD znalazła szerokie zastosowanie w ocenie roślin namnażanych z eksplantatów wierzchołkowych pędu [36], z eksplantatów węzłowych [26,29,37], z somatycznych zarodków [38], a szczególnie w celu potwierdzenia wierności genetycznej pędów przybyszowych zregenerowanych z eksplantatów w procesie organogenezy pośredniej, w stosunku do rośliny donorowej [35,39].

Przykładem są badania *Drosera anglica* i *D. binata*, gdzie porównywano dwa różne systemy rozmnażania *in vitro* – regenerację pąków przybyszowych z liścia oraz rozwój pąków z wierzchołków pędów. Pierwsza z metod potwierdziła jednorodność morfologiczną powstałych *de novo* pąków, jednakże wskazano na polimorfizm genetyczny rzędu 0,08 % u *D. anglica*, co sugerowało konieczność weryfikacji materiału roślinnego pochodzącego z kultur tego typu. Z kolei wykazano, że pąki zregenerowane z wierzchołków pędów obu gatunków nie różniły się morfologicznie ani genetycznie od rośliny donorowej, co wskazuje na zachowanie wierności genetycznej roślin potomnych namnażanych metodą pobudzania do rozwoju, istniejących w eksplantacie merystemów [36]. Innym przykładem jest opracowany protokół mikrorozmnażania *Magnolia sirindhorniae* z pąków bocznych, gdzie analiza genetyczna oparta na metodzie RAPD i ISSR potwierdziła jednorodność genetyczną materiału roślinnego uzyskanego z kultur *in vitro*, w porównaniu do rośliny donorowej [38]. Z kolei Rathore et al. w swoich badaniach nad opracowaniem najbardziej wiarygodnej metody rozmnażania *Aloe vera* w kulturach *in vitro* wykorzystali dwa systemy regeneracji –

bezpośrednio z pąków bocznych, jak i pośrednio przez stadium kalusa, gdzie eksplantatem była podstawa kwiatostanu. Zastosowane techniki RAPD i ISSR wskazały, iż pomimo podobieństw fenotypowych rośliny uzyskane poprzez stadium kalusa różniły się genetycznie od rośliny donorowej. Potwierdzono tym samym, że występowanie polimorfizmu genetycznego wiąże się z doбором odpowiedniej metody regeneracji [30].

ISSR jest techniką opartą na metodzie PCR i obejmuje amplifikację fragmentu DNA obecnego w możliwej do amplifikacji odległości między dwoma identycznymi sekwencjami mikrosatelitarnymi zorientowanymi w przeciwnych kierunkach. Analiza ISSR wykorzystuje starter mikrosatelitarny, obejmujący od 16 – 25 par zasad zakotwiczony na końcu 3' lub 5' [27]. Analiza ISSR pozwala na wykrycie polimorfizmu, który może wystąpić na skutek zmian długości odcinków leżących pomiędzy mikrosatelitami bądź miejscu przyczepu starterów [41]. Jest to metoda prosta, precyzyjna, wysoce różnicująca, odpowiednia do analizy dużej liczby próbek [35].

Przykładem zastosowania tej techniki są badania zregenerowanych *in vitro* pędów gatunku *Artemisia nilagirica* var. *nilagirica*. Z fragmentów gałązek z węzłami otrzymano organogenny kalus, formujące liczne pędy, które okazały się stabilne genetycznie [42]. W innym przypadku, analiza ISSR roślin *Gerbera jamesonii* zregenerowanych *in vitro* z liścia w procesie organogenezy pośredniej, wykryła wystąpienie zmienności, natomiast nie zaobserwowano zmian na poziomie genetycznym u roślin potomnych, gdy eksplantatem był kwiatostan lub wierzchołek pędu [43].

AFLP jest szeroko stosowaną techniką diagnostyczną. W początkowym etapie opiera się na podwójnym trawieniu DNA z użyciem enzymów restrykcyjnych, następnie ligacji adapterów na obu końcach fragmentów restrykcyjnych, a w końcowym etapie selektywną amplifikację tych fragmentów za pomocą reakcji PCR. Generuje to tzn. odcisk palca, wysoce specyficzny dla danego osobnika, odmiany bądź gatunku. Niewątpliwą zaletą analizy AFLP jest możliwość zbadania całego genomu, nie tylko jego fragmentu, pod kątem wystąpienia polimorfizmu oraz odtwarzalność tej metody. Metodę tę charakteryzuje większa czułość i mniejsza podatność na warunki przeprowadzenia reakcji w odniesieniu do technik RAPD i ISSR. Do wad można zaliczyć wysoki koszt jej przeprowadzenia [44]. W badaniach Peredo et al. z międzywęzłowych fragmentów łodygi chmielu zwy-

czajnego (*Humulus lupulus*) zaindukowano organogeny kalus, który na drodze organogenezy pośredniej dał początek zregenerowanym roślinom. Uzyskane subkultury (od 1 do 3) zostały poddane analizie AFLP, która wskazała na brak różnic między kontrolą (roślina z pola oraz roślinki z kultur *in vitro*) a regenerantami. Ponadto zastosowano metodę AFLP z wykorzystaniem endonukleaz wrażliwych na metylację – MSAP (ang. *Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*), która pozwala ocenić zmiany epigenetyczne na poziomie metylacji DNA w anonimowych regionach CCGG w genomie, związane ze zjawiskiem zmienności somaklonalnej. Umożliwiło to wykrycie zmian o charakterze epigenetycznym na skutek demetylacji w trzeciej subkulturze. Stwierdzono, iż czas hodowli przyczynia się do zwiększania dystansu genetycznego w porównaniu do kontroli [45]. Ponadto, Sharma i in. wykorzystując marker molekularny AFLP przeprowadzili kontrolę wierności genetycznej regenerantów *Solanum tuberosum* uzyskanych za pomocą trzech klonalnych dróg rozmnażania – proliferacji pąków kątowych, mikrotuberyzacji oraz embriogenezy somatycznej. Zaobserwowano bardzo niski poziom polimorfizmu genetycznego roślin uzyskanych z zarodków somatycznych i mikrotuberyzacji, natomiast nie wykryto żadnych zmian w obrębie klonów uzyskanych z pąków bocznych [46].

Metoda RFLP polega na przeprowadzeniu trawienia DNA specyficznymi endonukleazami restrykcyjnymi. Powstałe produkty są separowane na żelu agarozowym i poddawane hybrydyzacji ze znakowaną radioaktywnie sondą molekularną. Dla każdego gatunku uzyskuje się charakterystyczny wzór poziomych prążków DNA, które można następnie wyciąć i zsekwencjonować, umożliwiając jednoznaczny identyfikację danego organizmu. Technika RFLP posiada wiele zalet, jednakże należy do kosztownych i pracochłonnych metod. Obecnie rzadko stosowana

w detekcji somaklonalnej zmienności w kulturach *in vitro* w związku z rozwojem prostszych i tańszych metod [7,27,47].

W świetle aktualnie przyjętej metodologii oceny wierności genetycznej mikrosadzonek zaleca się weryfikację więcej niż jednego markera molekularnego [29].

Podsumowanie

Ocena stabilności genetycznej roślin rozmnażanych w kulturze *in vitro* powinna być każdorazowo przeprowadzana przy opracowywaniu protokołów mikrorozmnażania gatunków roślin leczniczych, które mają w danych warunkach kultury zachować poziom metabolitów rośliny donorowej.

Wykrywanie zmienności w zregenerowanych roślinach oparte na cechach morfologicznych nie jest precyzyjne, gdyż podobne fenotypowo rośliny mogą mieć inne właściwości molekularne. W celu potwierdzenia wierności genetycznej roślin uzyskanych w kulturach *in vitro*, w zależności od zastosowanej metody rozmnażania, należy przeprowadzić analizy cytogenetyczne lub molekularne, które stanowią wiarygodne metody oceny stabilności genetycznej klonów.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Natalia Turowska

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Św. Marii Magdaleny 14, 61-861 Poznań

☎ (+48 61) 668 78 67

✉ nslowinska@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Debnath, M, Malik CP, Bisen PS. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006;7(1):33-49.
2. Thiem B, Kikowska M. Zapewnienie jakości roślin leczniczych rozmnażanych w kulturach *in vitro*. *Herba Pol.* 2008;54(4):168-78.
3. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta.* 2018;248(1):1-18.
4. Linde van der PCG. Certified plants from tissue culture. In: Cassells AC (editor) *Proceedings of the International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation.* Cork, Ireland: Acta Hort. 2000;530:93-9.
5. European commission: EudraLex: The rules governing medicinal products in the European Union, vol. 4: Good Manufacturing Practice. Medicinal products for human and veterinary use. 2020; https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en.

6. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation – a novel source of variability for plant improvement. *Theor Appl Genet.* 1981;97:1027-214.
7. Bairu MW, Aremu AO, van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 2011;63:147-73.
8. Bach A, Pawłowska B. Procesy rozwojowe w kulturze *in vitro* i typy kultury. Malepszy S (red.). *Biotechnologia roślin.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2014. ss. 273-306.
9. Purohit S, Silva J, Habibi N. Current Approaches for Cheaper and Better Micropropagation Technologies. *Int J Plant Dev Biol.* 2011;5(1):1-36.
10. Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj YPS (editor) *Medicinal and Aromatic Plants I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 4. Berlin, Heidelberg: Springer; 1988. pp. 60-103.
11. Wang Q, Wang Y, Sun L, et al. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. *Plant Cell Rep.* 2012;31:1283-96.
12. Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv.* 2000;18(2):91-120.
13. Makowczyńska J, Andrzejewska-Golec E, Sliwińska E. Nuclear DNA content in different plant materials of *Plantago asiatica* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2008;94(1):65-71.
14. Kulus D. Stabilność materiału roślinnego po krioprezerwacji. *Zesz. Probl Post Nauk Roln.* 2016;586:109-23.
15. Chávez-Cortazar A, Mata-Rosas M, Oyama K, et al. Induction of somatic embryogenesis and evaluation of genetic stability in regenerated plants of *Magnolia dealbata*. *Biol Plant.* 2020;64(48):224–33.
16. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica.* 1995;85:295–302.
17. Borkowska B. Zmienność w kulturach *in vitro*. *Wiad. Bot.* 1995;39(3/4):53-7.
18. Śliwińska E. Flow cytometry – a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. *Folia Hort.* 2018;30(1):103-28.
19. Śliwińska E, Zimny J, Drozdowska L. Niestabilność poziomu ploidalności podczas regeneracji transformowanego i nietransformowanego tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). *Biotechnologia* 2003;3:260-6.
20. Śliwińska E, Thiem B. Genome size stability in six medicinal plant species propagated *in vitro*. *Biol Plant.* 2007;51:556-8.
21. Thiem B, Śliwińska E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. *Plant Sci.* 2003;164:129–34.
22. Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol.* 2000;43(2-3):179-88.
23. Śliwińska E. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin. *Biotechnologia.* 2002;1:122-8.
24. Endemann M, Hristoforoglu K, Stauber T, et al. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus Robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biologia Plant.* 2001;44(3):339-45.
25. Kikowska M, Thiem B. *In vitro* systems of selected *Eryngium* species (*E. planum*, *E. campestre*, *E. maritimum*, and *E. alpinum*) for studying production of desired secondary metabolites (phenolic acids, flavonoids, triterpenoid saponins, and essential oil). In: Ramawat KG, Ekiert HM, Goyal S (eds). *Plant cell and tissue differentiation and secondary metabolites. Fundamentals and applications.* Cham: Springer International Publishing; 2020. pp. 1-33.
26. Patil KS, Bhalsing SR. Efficient micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Boerhaavia diffusa* L- High trade medicinal plant. *Physiol Mol Biol Plants.* 2015;21:425-32.
27. Masojć P. Metody detekcji polimorfizmu sekwencji DNA i ich zastosowania. W: Malepszy S (red.). *Biotechnologia roślin.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2014. ss. 273-306.
28. Słomski R, Szalata M, Wielgus K. Diagnostyka molekularna. W: Słomski R (red.). *Analiza DNA: teoria i praktyka.* Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu; 2011. ss. 17-23.
29. Thakur J, Dwivedi MD, Sourabh P, et al. Genetic Homogeneity Revealed Using SCoT, ISSR and RAPD Markers in Micropropagated *Pittosporum eriocarpum* Royle – An Endemic and Endangered Medicinal Plant. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159050.
30. Rathore MS, Chikara J, Mastan SG, et al. Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR markers. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011;165(5-6):1356-65.
31. Rohela GK, Jogam P, Bylla P, et al. Indirect regeneration and assessment of genetic fidelity of acclimatped plantlets by SCoT, ISSR and RAPD markers in *Rauwolfia tetraphylla* L.: An endangered medicinal plant. *Biomed Res Int.* 2019;2019(1):1-14.
32. Srilakshmi A, Ugraiyah A, Gayatri MC, et al. Genetic fidelity in micropropagated plantlets of *Pimpinella tirupatiensis* – an endemic and threatened medicinal plant using RAPD and ISSR markers. *Int J Bioassays.* 2016;5(06):4661-6.
33. Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq EA. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 2002;128:9-17.
34. Saha S, Adhikari S, Dey T, Ghosh P. RAPD and ISSR based evaluation of genetic stability of micropropagated plantlets of *Morus alba* L. variety S-I. *Meta Gene.* 2016;7:7-15.
35. Piątczak E, Krolicka A, Wysokińska H. Morphology, secoiridoid content and RAPD analysis of plants regenerated from callus of *Centaurium erythraea* RAFN. *Acta Biol Cracov ser Bot.* 2011;53(2):79-86.
36. Kawiak A, Łojkowska E. Application of the rapid in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.* 2004;40:592-5.

37. Ahmad N, Javed SB, Khan MI, et al. Rapid plant regeneration and analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Vitex trifolia*: an important medicinal plant. *Acta Physiol Plant*. 2013;35:2493-500.
38. Shoyama Y, Zhu XX, Nakai R, et al. Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Cell Rep*. 1997;16:450-3.
39. Piątczak E, Kuźma Ł, Sitarek P, et al. Shoot organogenesis, molecular analysis and secondary metabolite production of micropropagated *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Plant Cell Tiss Org*. 2015;120:539-49.
40. Ciu Y, Deng Y, Zheng K, et al. An efficient micropropagation protocol for endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Sci Rep*. 2019;9:9634.
41. Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 2002;128:9-17.
42. Shinde S, Sebastian JK, Jain JR, et al. Efficient *in vitro* propagation of *Artemisia nilagirica* var. *nilagirica* (Indian wormwood) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants. *Physiol Mol Biol Plants*. 2016;22(4):595-603.
43. Bhatia R, Singh KP, Jhang T. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. *Sci Hortic*. 2009;119(2):208-11.
44. Tamayo-Ordoñez M, Huijara-Vasconcelos J, Quiroz-Moreno A, et al. Plant Tissue Culture and Molecular Markers. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds). *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2018. 877:343-56.
45. Peredo EL, Revilla MA, Arroyo-García R. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. *J Plant Physiol*. 2006;163(10):1071-9.
46. Sharma SK, Bryan GJ, Winfield MO, et al. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*. 2007;226(6):1449-58.
47. Titanji VPK, Ngwa-Amambua A, Ngemenya M. Applications of biotechnology techniques to the study of medicinal plants. *Afr J Med Sci*. 2007;36:23-9.