

## METODY BIOTECHNOLOGICZNE W UTRZYMANIU I OCENIE ZASOBÓW GENOWYCH

*Katarzyna Niemirowicz-Szczytt*

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Biotechnologia roślin wykorzystuje metody biologiczne dla produkcji dóbr i usług. Pewne metody biologiczne mogą być pomocne w utrzymywaniu i ocenie zasobów genowych.

W ochronie zasobów genowych stosuje się techniki kultur tkankowych i techniki szeroko pojętej biologii molekularnej.

Najczęściej kolekcje roślinne przechowywane są w postaci nasion. Jest to uzasadnione tym, że nasiona zajmują stosunkowo mało miejsca i zwykle mogą być przechowywane przez wiele lat. Zastosowanie niskich temperatur może przyczynić się do przedłużenia okresu przechowywania. Są jednak pewne gatunki, które nie mogą być przechowywane w ten sposób z powodu ograniczonej żywotności nasion. Może to być również brak okresu spoczynku, wrażliwość na wysuszenie lub nie tolerowanie niskich temperatur. Inną przyczyną może być niszczenie nasion przez patogeny lub szkodniki.

Wiadomo, że pewne gatunki są rozmnażane tylko wegetatywnie, np. ziemniak, bataty czy kawa. Materiał roślinny takich form może być łatwo utracony na skutek warunków zewnętrznych. W tych przypadkach przechowywanie *in vitro* może być znaczną pomocą i udogodnieniem.

### **Przechowywanie materiałów roślinnych *in vitro***

Zaletą rozmnażania i przechowywania *in vitro* jest stosunkowo niewielka powierzchnia potrzebna do utrzymania kolekcji. Rośliny są wolne od patogenów i szkodników i przy zachowaniu odpowiednich warunków

mogą być mnożone stosunkowo rzadko [BHOJWANI, RAZDAN 1996].

W przechowywaniu organów lub tkanek najczęściej stosuje się warunki spowalniające wzrost (obniżona temperatura i intensywność światła) oraz pożywki ubogie w składniki odżywcze z ograniczoną zawartością sacharozy.

Takie warunki pozwalają na przechowywanie pojemników szklanych z roślinami od kilku miesięcy do 2 lat bez potrzeby pasażowania. Dla przykładu merystemy i wyrastające z nich pędy kawy mogą być przechowywane do 2,0–2,5 lat [KARTHA i in. 1981]. Przechowywanie kolekcji ziemniaka *in vitro* stało się niemal rutyną. Stosuje się tu procedurę mającą na celu uwolnienie materiału roślinnego od wirusów, uzyskanie zdrowych, ukorzenionych roślin, a następnie otrzymanie mikro-bulw, które są przechowywane do trzech lat w obniżonej temperaturze [FLETCHER i in. 1998]. Materiały kolekcyjne *in vitro* najczęściej rozmnażane są z merysystemów pędu głównego lub pąków bocznych. Ten system rozmnażania pozwala na uzyskanie zdrowych pędów wolnych od wirusów, a następnie roślin (klonów) identycznych z rośliną donorową. Innymi słowy jest to system pozwalający na unikanie zmienności somaklonalnej.

Dodatkowym istotnym czynnikiem, który należy uwzględnić w czasie długiego przechowywania jest wymiana gazowa. Silnie ograniczona wymiana gazowa powoduje wityfikację tkanki.

Wiele gatunków roślin tropikalnych, a nawet ciepłolubnych nie toleruje obniżonej temperatury przechowywania, np. pędy lub zarodki palmy kokosowej nie mogą być przechowywane w temperaturze niższej niż 18°C [CORBINEAU i in. 1990]. W przypadku pędów banana najlepsze wyniki otrzymywano w temperaturze 17°C. Ponadto pędy te lepiej przechowywały się na wacie nasączonej 3% roztworem rybozy niż na pożywce agarowej [KO i in. 1991].

Rozwój metod produkcji zarodków somatycznych spowoduje prawdopodobnie, że będą mogły być przechowywane „sztuczne” nasiona bądź same zarodki. Pomocne będą różne techniki desykcji. Somatyczne zarodki *Medicago sativa* po obniżeniu zawartości wody do 15% mogły być przechowywane przez 8 miesięcy w temperaturze pokojowej [MCKERSIE i in. 1993]. Wierzchołki wzrostu tropikalnego drzewa *Guazuma crinita* zamknięte w kapsułkach z alginianu wapnia i przechowywane na pożywce agarowej zachowały 90% żywotności po 12 miesiącach przechowywania w 25°C [MARUYAMA i in. 1998].

W mniejszym stopniu stosuje się metody polegające na zamrażaniu tkanek lub komórek w temperaturze ciekłego azotu (LN – liquid nitrogen), czyli w temperaturze około –196°C.

Mimo znacznych postępów, trudno jeszcze o uzasadnioną ekonomicznie procedurę, która pozwalałaby na zmrożenie w ciekłym azocie tkanki na wiele lat i pozyskanie z tej tkanki komórek czy organów zdol-

nych do regeneracji w wysokim stopniu, wolnych od zmian genetycznych. W procedurze zamrażania elementem istotnym jest odwodnienie lub wiotryfikacja zarodków lub merystemów [YAMADA i in. 1991; ABDELNOUR-ESQUIVEL i in. 1992]. Znacznie lepiej udaje się zamrażanie wysuszonych nasion i jest ono stosowane dla pewnych gatunków.

### **Techniki biologii molekularnej w przechowywaniu i ocenie materiałów roślinnych**

W miarę rozwoju technik związanych z izolacją, oczyszczaniem, klonowaniem, manipulowaniem i charakterystyką DNA, coraz częściej przechowuje się wybrane fragmenty, a nawet całe biblioteki DNA (cDNA). DNA w postaci wybranych fragmentów (genów) lub umieszczone w bibliotekach może być przechowywane (zabiera niewiele miejsca), przesyłane i podlegać wymianie.

Do oceny zasobów genowych są najczęściej wykorzystywane metody molekularne, które pozwalają na uzyskanie tzw. markerów molekularnych. Nieco wcześniej opracowane metody, oparte na charakterystyce izoenzymatycznej, ustąpiły analizom DNA. Gwałtowny rozwój technik wykorzystujących polimorfizm DNA pozwala na zastosowanie markerów molekularnych dla charakterystyki struktury populacji, na szukanie prób z odpowiednimi genami, na ujawnianie duplikatów czy też sprawdzanie czystości próby.

Wybór właściwej metody (RFLP, RAPD, AFLP, SSR) jest niezwykle ważny dla uzyskania wyników przydatnych do oceny zasobów genowych.

Warto zatem podać krótką charakterystykę metod najczęściej stosowanych [KARP, EDWARDS 1997].

Metoda **RFLP (restriction fragment length polymorphism)** należy do najstarszych. Procedura polega na izolacji, a następnie trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym, rozdzielaniu fragmentów DNA na żelu agarozowym, przeniesieniu fragmentów na filtr i hybrydyzacji fragmentów z sondą molekularną. Zaletą tej metody jest uzyskiwanie powtarzalnych wyników, bezpośrednie wykazanie zmienności i brak potrzeby używania starterów (primers). W przypadku prac genetycznych korzystna jest możliwość odróżnienia homozygot i heterozygot.

Wadą tej metody jest długa i kosztowna procedura oraz potrzeba izolacji dużej ilości DNA (ok. 10  $\mu\text{g}$ /trawienie). Do identyfikacji genów potrzebne są dobre sondy. W pewnych przypadkach polimorfizm uzyskiwany tą metodą jest niewystarczający.

Nowsze metody często porównuje się do metody RFLP i w pewnych

przypadkach jest ona oceniana jako lepsza [HAHN i in. 1995] lub jako gorsza [LU i in. 1996].

Druga z wymienionych metod, oznaczana symbolami **RAPD (random amplified polymorphic DNA)** jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych. Wykorzystuje się w niej procedurę techniki PCR (polymerase chain reaction). Metoda polega na izolacji i oczyszczeniu DNA, na powielaniu czyli amplifikacji odcinków DNA (w urządzeniu zwanym termocyklerem – termoblokiem) przy użyciu starterów (10–20 nukleotydów). Uzyskany produkt jest rozdzielany na żelu agarozowym, barwiony bromkiem etydy, a następnie wizualizowany w UV.

Zaletą metody jest, że jest szybka, tania i do analizy wystarczy niewielka ilość DNA (10 ng/reakcję). W wyniku otrzymuje się zwykle zadowalający polimorfizm (o ile nastąpi właściwy dobór starterów). Nie ma potrzeby używania sond, a informacja o sekwencjach nie jest konieczna. Wadą tej metody jest średnia powtarzalność wyników (różne termocyktery, polimerazy, startery) i zwykle analiza większej liczby osobników. W przypadku prac genetycznych wadą jest uwidacznianie tylko markerów dominujących.

Obecnie metoda ta często jest wykorzystywana do badania genetycznego pokrewieństwa i zmienności. Przykładem są prace prowadzone na gatunkach *Phaseolus* [FREYRE i in 1996; FOTANA i in. 1997], na *Allium* [THIERRY i in. 1997], *Medicago* [GNERARDI i in. 1998] i wielu innych.

Metoda **AFLP (amplified fragment length polymorphism)** bazuje na procedurze pośredniej między RFLP i RAPD. Jak każda z tych metod zaczyna się od izolacji DNA. Potem następuje trawienie i preselekcja z adapterami łączonymi z końcami fragmentów. To umożliwi selektywną amplifikację fragmentów ze starterami homologicznymi do miejsc restrykcji (oznakowanymi radioaktywnie lub fluorescencyjnie). Startery wzbogacone są w dodatkowe fragmenty. Ilość powielonych fragmentów ograniczona jest do 150–200, tak by można je rozdzielić na żelu. Zaletą metody jest wysoki polimorfizm i powtarzalne wyniki. Wadą jest konieczność uzyskania większej ilości DNA niż w metodzie RAPD (ok. 1  $\mu$ g/reakcję), używanie zwykle radioaktywnych odczynników i wymóg większej sprawności technicznej. Odczytanie żelu wymaga czytnika, a wynik – statystycznego opracowania. W przypadku prac genetycznych ujemną stroną są markery dominujące. W pracy z różnymi gatunkami i formami marchwi porównano wyniki otrzymane metodą RAPD i AFLP [NAKAJIMA i in 1998]. W przypadku metody AFLP otrzymano cztery razy więcej prążków na jedną analizę w porównaniu do metody RAPD. Jednak obie metody doprowadziły do podobnych wniosków i powstania podobnego dendrogramu. Te same techniki zastosowane do genomu mitochondrialnego dały znacznie gorsze wyniki.

Metoda SSR (**microsatellites lub simple sequence repeats**) wykorzystuje krótkie, proste sekwencje powtórzone. Klonowanie i sekwencjonowanie locus SSR pozwala zaprojektować startery do sekwencji flankujących. Rozdział następuje na żelu agarozowym lub żelu do sekwencjonowania. Zaletą tej metody jest wysoki polimorfizm i powtarzalność wyników.

Metoda uważana jest za szybką i tanią. Daje markery kodominujące. Markery tego typu nie nadają się do badań ewolucyjnych. Odpowiednie sekwencje powtórzone są rzadsze u roślin niż u zwierząt. Metodę tę wykorzystano np. do analiz gatunków *Lactuca*, *Lycopersicon* i różnych form *Zea mays* [VOSMAN, ARENS 1997; SENIOR i in. 1998; WIEL i in. 1998].

Podjęwając decyzję o zastosowaniu metody trzeba odpowiedzieć na pytania: a) czy uzyskamy odpowiedni polimorfizm? b) czy metoda jest powtarzalna? c) jak można przechowywać uzyskane w trakcie analiz dane? Nie bez znaczenia są oczywiście koszty różnych typów analiz. Orientacyjną charakterystykę metod pod tym względem podano w tab. 1. Tabela ta streszcza również to, co powiedziano wyżej o zaletach i wadach zastosowanych metod.

Tabela 1; Table 1

Porównanie różnych technik molekularnego testowania  
[JONES i in. 1997, zmodyfikowane; KARP, EDWARDS 1997]  
Comparison of different techniques of molecular testing  
[JONES et al. 1997, modified; KARP, EDWARDS 1997]

Charakterystyka Characteristics	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Polimorfizm Polymorphism	niski/średni low/medium	średni medium	średni medium	wysoki high
Powtarzalność Reproducibility	wysoka high	niska low	średnia medium	wysoka high
Umiejętności tech. Technical abilities	niewielkie low	niewielkie low	średnie/wysokie medium/high	niewielkie/średnie low/medium
Koszt próby Cost per assay (USD)	2,00	1,00	1,50	1,00
Radioaktywność Radioactivity	tak/nie yes/no	nie no	tak/nie yes/no	tak/nie yes/no
Ilość prób/dzień Samples/day	20	50	50	50

Na pytanie dotyczące powtarzalności wyników próbowano odpowiedzieć w pracy powstałej po realizacji projektu badawczego, finansowanego przez komisję Wspólnoty Europejskiej [JONES i in. 1997]. W pracy tej te-

stowano materiał roślinny trzema metodami (dwa klony mieszańcowe topoli – RAPD, dwa klony buraka cukrowego – AFLP, dwie odmiany pomidora uprawnego i dwa klony *Lycopersicon peruvianum* – SSR). Dla każdej techniki wybrano sprawdzony protokół i laboratorium wiodące. Protokół przekazano 8 innym laboratoriom w przypadku metody RAPD i 6 w przypadku metody AFLP i SSR.

W końcowej ocenie stwierdzono, że metoda RAPD jest trudna do powtórzenia. Podkreślono, że powtarzalność wyników zależy w dużym stopniu od jakości Taq polimerazy i termocyklera. W przypadku AFLP stwierdzono, że była to początkowo metoda trudna i w pierwszych analizach brakowało około 50% prążków. Wraz ze zdobytym doświadczeniem wada ta ustąpiła i otrzymano wysoki stopień powtarzalności. Zauważono różnicę tylko jednego prążka w jednym doświadczeniu i w jednym laboratorium z siedmiu, biorących udział w doświadczeniu. W przypadku techniki SSR otrzymano powtarzalne wyniki. Zauważono jedynie małe różnice w wielkości prążków.

## Literatura

- ABDELNOUR-ESQUIVEL A., VILLALOBOS V., ENGELMAN F. 1992. *Cryopreservation of zygotic embryos of Coffea spp.* Cryo-letters. 13: 297–302.
- BHOJWANI S.S., RAZDAN M.K. 1996. *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition.* ELSEVIER Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: 767 ss.
- CORBINEAU F., ENGELMANN F., COME D. 1990. *Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) somatic embryos.* Plant Science 71: 29–34.
- FLETCHER P.J., FLETCHER J.D., CROSS R.J. 1998. *Potato germplasms; in vitro storage and virus reduction.* New-Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 26: 249–252.
- FOTANA B., VEKEMANS X., JARDIN P., BAUDOIN J.P. 1997. *Genetic diversity in lima bean (Phaseolus lunatus L.) as revealed by RAPD markers.* Euphytica 95: 157–165.
- FREYRE R., RIOS R., GUZMAN L., DEBOUCK D.G., GEPTS P. 1996. *Ecogeographic distribution of phaseolus spp. (Fabaceae) in Bolivia.* Economic Botany 50: 195–215.
- GNERARDI M., MANGIN B., GOFFINET B., BONNET D., HUGUET T., ROGERS J.S. 1998. *A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (Medicago sativa) using RAPD molecular markers.* Theoretical and Applied Genetics 96: 406–412.
- HAHN V., BLANKENHORN K., SCHWALL M., MELCHINGER A.E., MALECOT G., JACCARD P. 1995. *Relationship among early European maize inbreds. III: Genetic*

diversity revealed with RAPD markers and comparison with RFLP and pedigree data. *Maydica* 40: 299–310.

JONES C.J., EDWARDS K.J., CASTIGLIONE S., WINFIELD M.O., SALA F., WIEL van de C., BREDEMEIJER G., VOSMAN B., MATTHES M., DALY A., BRETTSCHEIDER R., BETTINI P., BUIATTI M., MAESTRI E., MALCEVSKI A., MARMIROLI N., AERT R., VOLCKAERT G., RUEDA J., LINACERO R., VASQUEZ A., KARP A. 1997. *Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR makers in plants by a network of European laboratories*. *Molecular Breeding* 3: 381–390.

KARP A., EDWARDS K.J. 1997. *Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity*. W: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report of IPGRI Workshop 9–11 October 1995. Rome, Italy: 11–38.

KARTHA K.K., MROGINSKI L.A., PAHL K., LEUNG N.L. 1981. *Germlasm preservation of coffee (Coffea arabica L.) by in vitro culture of shoot apical meristems*. *Plant Sci. Lett.* 22: 301–307.

KO W.H., HWANG S.C., KU F.M. 1991. *A new technique for storage of meristem-tip cultures of 'Cavendish' banana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 25: 179–183.

LU J., KNOX M.R., AMBROSE M.J., BROWN J.K.M., ELLIS T.H.N. 1996. *Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR- based methods*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1103–1111.

MCKERSIE B.D., SENARATNA T., BOWLEY S.R., BROWN D.C.W., KIELLY A., KROCHENKO J.E., BEWLEY J.D. 1990. *Artificial seeds application in the production of hybrid alfalfa (Medicago sativa)*. W: *Abstr. VIIth Int. Cong. Plant Tissue Culture*, Amsterdam: 259.

MARUYAMA E., ISHII K., KINOSHITA I. 1998. *Alginate encapsulation technique and cryogenic procedures for long-term storage of the tropical forest tree Guazuma crinita Mart. in vitro cultures*. *JARQ – Japan Agricultural Research Quarterly*. 32: 301–309.

NAKAJIMA Y., OEDA K., YAMAMOTO T. 1998. *Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in Daucus varieties by RAPD and AFLP*. *Plant Cell Reports* 17: 848–853.

SENIOR M.L., MURPHY J.P., GOODMAN M.M., STUBER C.W. 1998. *Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using agarose gel system*. *Crop Science* 38: 1088–1098.

THIERRY D., ENNEQUIN M., PANAUD O., ROBERT T., RICOCH A. 1997. *Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of Allium cepa using morphological traits and rapid markers*. *Heredity* 78: 403–409.

VOSMAN B., ARENS P. 1997. *Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato*. *Genome* 40: 25–33.

WIEL van de C., ARENS P., VOSMAN B. 1998. *Microsatellite fingerprinting in lettuce (Lactuca sativa L.) and wild relatives*. *Plant Cell Reports* 17:

837–842.

YAMADA T., SAKAI A., MATSUMURA T., HIGUCHI S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78: 81–87.

**Słowa kluczowe:** zasoby genowe, biotechnologia, kultura tkanek roślinnych, markery molekularne

### Streszczenie

Biotechnologia roślin wykorzystuje dla swoich celów techniki kultur tkankowych i biologii molekularnej. Techniki te są użyteczne w ochronie i ocenie zasobów genowych.

Techniki kultur tkankowych zastosowano do mnożenia i utrzymywania materiałów kolekcyjnych, szczególnie dla gatunków rozmnażających się wegetatywnie, takich jak: *Solanum*, *Ipomea* lub *Coffea*. O ile to jest możliwe, rozmnożone *in vitro* rośliny, przechowywane są w warunkach spowalniających wzrost (obniżona temperatura i intensywność światła), co pozwala na przechowywanie pojemników z roślinami do 2 lat bez potrzeby pasażowania.

W miarę rozwoju technik związanych z izolacją, oczyszczaniem, klonowaniem, manipulowaniem i charakterystyką DNA coraz częściej przechowuje się wybrane fragmenty, a nawet całe biblioteki DNA (cDNA). W takiej formie mogą podlegać wymianie między instytucjami na całym świecie.

Do charakterystyki różnorodności biologicznej w kolekcjach można wykorzystywać markery molekularne. Polimorfizm DNA pozwala na charakterystykę struktury populacji, na ujawnianie duplikatów, na sprawdzanie czystości próby czy też na szukanie prób z odpowiednimi genami. Jednak nie każda metoda molekularna jest jednakowo przydatna do charakterystyki roślin. Podejmując decyzję o zastosowaniu metody (RFLP, RAPD, AFLP, SSR) trzeba odpowiedzieć na pytania: a) czy uzyskamy odpowiedni polimorfizm? b) czy metoda jest powtarzalna? c) jak można przechowywać uzyskane w trakcie analiz dane? d) jakie są koszty? W pracy przedstawiono próbę oceny aktualnie stosowanych metod pod kątem postawionych pytań.

## BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR MAINTAINING AND CHARACTERIZING GENETIC RESOURCES

Katarzyna Niemirowicz-Szczytt

Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology,  
Warsaw Agricultural University, Warszawa

**Key words:** genetic resources, biotechnology, plant tissue culture, molecular markers

## Summary

Plant biotechnology employs tissue culture and molecular biology techniques which prove to be useful for maintaining and estimating genetic resources.

The tissue culture technique has been applied in plant collection propagation and maintenance, particularly for vegetatively propagated crops, such as *Solanum*, *Ipomea* or *Coffea*. If it is possible, plant material is stored in the conditions slowing down its growth (lower temperature and diffuse light) so that the storage time can be prolonged up to 2 years and there is no need to refresh the medium.

Another type of storage which is becoming more and more popular consists of isolation, purification, cloning, manipulation and identification of DNA. Selected fragments or even whole DNA libraries (cDNA) can easily be stored and then used for exchange between different genetic resource institutions all over the world.

In order to characterise germplasm diversity, it is possible to use molecular markers. Molecular techniques implementing DNA polymorphism allow to characterise the population structure, reveal duplicates, check sample homogeneity and identify the sample with required gene. However, not every molecular method is equally suitable for germplasm characterisation. In order to make the proper choice among the recently applied methods: RFLP, RAPD, AFLP or SSR, it is necessary to answer the following questions:

- will the polymorphism level be adequate?
- is the method reproducible?
- how can we store and use the data obtained?
- what are the costs?

The paper makes an attempt to evaluate the most common methods with respect to these qualities.

Prof. dr hab. Katarzyna **Niemirowicz-Szczytt**  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
ul. Nowoursynowska 166  
02-787 WARSZAWA  
e-mail: niemirowicz@alpha.sggw.waw.pl