

## Evaluation of genetic stability of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants obtained from unfertilized ovules using RAPD markers

### Ocena stabilności genetycznej roślin buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) zregenerowanych z niezapłodnionych zalążków za pomocą markerów RAPD

Magdalena Tomaszewska – Sowa<sup>1</sup> (✉), Dorota Olszewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz, Department of Agricultural Biotechnology, Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz Poland

<sup>2</sup> University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz, Department of Agricultural Biotechnology, Prof. S. Kaliskiego 7, 85-789 Bydgoszcz, Poland

✉ Corresponding author: [magda@utp.edu.pl](mailto:magda@utp.edu.pl)

#### ABSTRACT

In order to improve methods of embryo regeneration applied so far in *in vitro* cultures, a two-phased, innovative method involving liquid and solid media was used. Regeneration of ovules with the application of the gynogenesis technique takes place mainly through indirect organogenesis, which involves the formation of callus and the possibility of somaclonal variation. In the research, the DNA was isolated from the leaves of 10 regenerants, previously rooted and planted into the field. 5 of them were characterized by a haploid number of chromosomes whereas the others were of diploid nature. As a control, DNA originating from the leaves of a haploid plant growing in *in vitro* cultures on growth regulator-free MS medium was used. Plants regenerated on media of various quantitative and qualitative composition in terms of phytohormonal characteristic. The results of the experiment showed that 9 out of 19 tested primers generate polymorphic bands while the remaining 10 amplify the same DNA fragments in all tested samples. The polymorphism effect was revealed in 4 plants with diploid genome and in 1 haploid plant. In total, 13 polymorphic bands were identified and 11 of them were detected in diploid DNA.

**Keywords:** gynogenesis, PCR, RAPD, somaclonal variation, sugar beet

#### STRESZCZENIE

W celu udoskonalenia metod regeneracji zalążków w kulturach *in vitro* zastosowano dwufazową, nowatorską metodę, polegającą na wykorzystaniu pożywki płynnej i stałej. Regeneracja zalążków techniką gynogenezy zachodziła głównie drogą organogenezy pośredniej w trakcie której formował się kalus co wiązało się z możliwością wystąpienia zmienności somaklonalnej. Chcąc dokonać identyfikacji zmienności genetycznej zachodzącej w trakcie kultury wykonano analizy RAPD. DNA wyizolowano z liści 10 regenerantów, ukorzenionych i wysadzonych w pole, wśród których 5 charakteryzowało się haploidalną liczbą chromosomów a pozostałe diploidalną. Jako kontrolę zastosowano DNA pochodzące z liści rośliny haploidalnej rosnącej w kulturach *in vitro*, na pożywce bez regulatorów wzrostu. Rośliny regenerowały na pożywkach o różnym składzie ilościowym i jakościowym pod względem fitohormonalnym. Wyniki eksperymentu wykazały, iż 9 spośród 19 badanych starterów generuje polimorficzne prążki natomiast 10 pozostałych amplifikuje te same fragmenty DNA we wszystkich badanych próbach. Efekt polimorfizmu ujawnił się w 4 roślinach o genomie diploidalnym i w 1 haploidzie. Łącznie zidentyfikowano 13 prążków polimorficznych, z czego 11 wykryto wyłącznie w DNA diploidów.

**Słowa kluczowe:** burak cukrowy, gynogeneza, PCR, RAPD, zmienność somaklonalna

## DETAILED ABSTRACT

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) demonstrates difficulties in regeneration of haploid shoots in both anther cultures and isolated microspores, therefore beet haploid is obtained primarily as a result of *in vitro* gynogenesis. Regeneration of ovules with the application of the gynogenesis technique takes place mainly through indirect organogenesis, which involves the formation of callus and the possibility of somaclonal variation. Thus, the presence of diploids among regenerants may either be the result of increased DNA level during the development and differentiation of callus or it can indicate the origin of shoots from somatic cells. The aim of the experiment was to identify the gametoclonal variability occurring during the morphogenesis processes of beet plants with the application of molecular markers RAPD.

Test material consisted of unfertilised ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), incubated in liquid Murashige and Skoog medium containing 4.4  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine and the control was growth regulator-free Murashige and Skoog medium. After approximately 12 weeks, the differentiating tissues regenerated on media containing various combinations of auxins and cytokinins. The rhizogenesis occurred in the presence of 14.8  $\mu\text{M}$  indole-3-butyric acid and 0.049  $\mu\text{M}$  6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purine. After several weeks of acclimation, the rooted shoots were planted in the field. The DNA was isolated from the leaves of 10 regenerants: 5 characterized by a haploid number of chromosomes and 5 by a diploid number of chromosomes. DNA originating from the leaves of a haploid plant growing in *in vitro* cultures on growth regulator-free Murashige and Skoog medium was used as a control. DNA isolation was performed by Davis et al. (1986) method. The PCR reaction was carried out using the modified method of Williams et al. (1990) and involved 19 primers (*Symbios*, Poland).

The results of the experiment showed that 10 of the tested primers amplified monomorphic DNA fragments in all tested genotypes, while the remaining 9 generated polymorphic bands. The polymorphism percent for these primers ranged from 1.14% to 25%. In total, 13 polymorphic bands were identified, 11 of them were detected only in diploid DNA, 1 in the haploid plant and 1 was present in both the DNA of a haploid and diploid plant. Among the changes detected in the DNA sequences 10 involved lack of amplification of fragments and 3 appearance of additional bands. The highest variability was demonstrated for the DNA of a diploid plant marked with number 6, regenerated on a medium containing 4.4  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine., for which 10 polymorphic products were detected. On media supplemented with 4.4  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine and 0.44  $\mu\text{M}$  naphthaleneacetic acid and also for the combination 4.4  $\mu\text{M}$  kinetin and 0.44  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid, shoots characterized by 8 sequence changes within the DNA were received, with the modifications similar for both plants numbered as 7 and 9. In case of plant number 8 obtained on medium with 4.4  $\mu\text{M}$  kinetin and 0.44  $\mu\text{M}$  naphthaleneacetic acid only 2 polymorphic bands were identified. In the DNA of the shoots formed in the presence of 1.0  $\mu\text{M}$  thidiazuron and 1.0  $\mu\text{M}$  indole-3-butyric acid, the primers used did not demonstrate presence of any polymorphic sequences.

Among haploid plants, polymorphism was detected only in case of the regenerant number 4, obtained on the medium with 4.4  $\mu\text{M}$  kinetin and 0.44  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid. The P3 primer used in the experiment generated the formation of 1 polymorphic product, while 1 fragment was not amplified by the P16 primer. On the basis of the obtained results, the coefficients of genetic distance were calculated, which ranged from 0 to 0.024 for the evaluated genotypes, indicating their close genetic background. The degree of genetic differentiation between regenerants was illustrated with a dendrogram, on which diploid genotypes number 6 and number 8 were distinguished, no differences between diploids marked with numbers 7 and 9 were found and the diploid plant number 10 formed a homogeneous group with haploids 1-5 obtained in the experiment. On the basis of the research, the effect of polymorphism was identified mainly among diploid plants. The observed polymorphism of DNA fragments found mainly among plants with diploid chromosomal number may be caused by bigger instability of the genetic material in diploid cells and it can result from spontaneous diploidization taking place during culture.

## WSTĘP

Burak cukrowy (*Beta vulgaris* L.) określany jest jako gatunek strategiczny ze względu na jego wyjątkowe znaczenie gospodarcze. Uzyskiwanie nowych odmian, znacznie przewyższających wartością użytkową odmiany dotychczas stosowane, stało się możliwe dzięki osiągnięciom technik kultur *in vitro*, wspierających hodowlę prowadzoną metodami tradycyjnymi. Istotna dla hodowli buraka jest produkcja haploidów i podwojonych haploidów, dzięki czemu uzyskuje się w jednym pokoleniu linie homozygotyczne, co pozwala na znaczne skrócenie cyklu hodowlanego. W związku z tym, iż gatunek ten przejawia trudności w regeneracji haploidalnych pędów z pylników lub izolowanych mikrospor, haploidy buraka można pozyskać w kulturach *in vitro* głównie na drodze gynogenezy. Pierwsze informacje o indukcji haploidalnych roślin buraka cukrowego w kulturach *in vitro* niezapłodnionych zalążków pochodzą z roku 1983, kiedy to Hosemans i Bossoutrot otrzymali regeneranty z zalążków izolowanych z pędów męskosterylnych. W następnym roku autorzy przeprowadzili ich diploidyzację (Hosemans i Bossoutrot, 1985) przy zastosowaniu kolchicyny i otrzymali homozygotyczne linie podwojonych haploidów. Badania prowadzone w kolejnych latach dotyczyły optymalizacji najważniejszych czynników decydujących o wydajności gynogenezy. Analizowano wpływ genotypu (Van Geyt i in., 1987; Weich i Levall, 2003), kondycję roślin donorowych (Doctrinal i in., 1989), fazę rozwojową woreczka zalążkowego (Lux i in., 1990; Wang i in., 1991; Gośka, 1997; Gürel i in., 2000), skład pożywki (Doctrinal i in., 1990; Yu, 1992; Tomaszewska-Sowa, 2012) oraz warunki prowadzenia kultury (Pazuki i in., 2018a, Pazuki i in., 2018b). Regeneracja zalążków techniką gynogenezy zachodzi głównie drogą organogenezy pośredniej. Formowanie się kalusa w przebiegu gynogenezy nie jest procesem korzystnym, bowiem wiąże się z możliwością wystąpienia zmienności somaklonalnej (Yang i Zhou, 1982). Obecność diploidów wśród regenerantów uzyskanych z zalążków może więc być wynikiem zwiększenia poziomu DNA w czasie rozwoju i różnicowania kalusa, może też wskazywać na pochodzenie pędów z komórek somatycznych. Znane są

liczne systemy umożliwiające identyfikację zmienności. Jedną z nich jest polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA (RAPD). Metoda RAPD pozwoliła na identyfikację dystansu pomiędzy populacjami buraka cukrowego o różnym zasięgu terytorialnym (Driessen i in., 2001). Na podstawie molekularnych markerów RAPD prowadzono również ocenę zróżnicowania genetycznego roślin buraka w obrębie gatunku (Shen i in., 1996; McGrath i in., 1999) oraz identyfikację mieszańców (Sadoch i in., 2003). Techniki RAPD umożliwiły też ocenę polimorfizmu pomiędzy zregenerowanymi roślinami uzyskanymi z różnych eksplantatów wyjściowych np. z protoplastów mezofilowych (Lenzner i in., 1995; Jażdżewska i in., 2000), protoplastów szparkowych (Wiśniewska, 2006) lub fragmentów liści (Munthali i in., 1996). Celem prezentowanej pracy było zastosowaniem markerów molekularnych RAPD do identyfikacji zmienności gametoklonalnej pojawiającej się w trakcie procesów morfogenezy roślin buraka cukrowego.

## MATERIAŁ I METODY

### *Roślinne kultury in vitro*

Materiał do badań stanowiły niezapłodnione zalążki buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.), genotyp 0170 (Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego) o wysokiej efektywności regeneracji. Zalążki izolowano z pąków kwiatowych, a następnie w celu indukcji morfogenezy, inkubowano w płynnej pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) zawierającej 4,4  $\mu\text{M}$  6-benzyloaminopuryna (BAP). W kolejnym etapie, po około 12 tygodniach, różnicujące się tkanki przenoszono na stałe pożywki regeneracyjne zawierające różne kombinacje regulatorów wzrostu z grupy auksyn: kwas naftylo-1-octowy (NAA), kwas indolilo-3-masłowy (IBA), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) i cytokinin: BAP, kinetyna (KIN), tidiazuron (TDZ) (Tabela 1). W celu indukcji ryzogenezy pędy umieszczono na pożywce MS uzupełnionej 14,8  $\mu\text{M}$  IBA oraz 0,049  $\mu\text{M}$  6-( $\gamma,\gamma$ -dimetyloalliloamino)-puryną (2iP). Ukorzenione rośliny oczyszczono z agaru i przenoszono do sterylnego podłoża (mieszanina ziemi ogrodniczej i perlitu), a następnie umieszczono w szklarni pod namiotem

**Table 1.** Composition and concentration of growth regulators applied and ploidy of plants analyzed using the RAPD method**Tablica 1.** Skład i stężenie regulatorów wzrostu oraz stopień ploidalności roślin analizowanych metodą RAPD

Regenerants Regeneranty	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Growth regulators Regulatory wzrostu	4,4 μM BAP	4,4 μM BAP	4,4 μM KIN	4,4 μM KIN	1,0 μM TDZ	4,4 μM BAP	4,4 μM BAP	4,4 μM KIN	4,4 μM KIN	1,0 μM TDZ
	-	0,44 μM NAA	0,44 μM NAA	0,44 μM 2,4-D	1,0 μM IBA	-	0,44 μM NAA	0,44 μM NAA	0,44 μM 2,4-D	1,0 μM IBA
Ploidy Ploidalność	1n	1n	1n	1n	1n	2n	2n	2n	2n	2n

foliowym. Po kilkutygodniowym okresie aklimatyzacji ukorzenione pędy wysadzono na polu.

#### **Ocena ploidalności i stabilności genetycznej uzyskanych regenerantów**

W celu określenia stopnia ploidalności pędów zregenerowanych w kulturach załączków fragmenty tkanki rozdrobniono w obecności 1 ml buforu lizującego, zawierającego: 100 mM Tris, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 85 mM NaCl, 1 ml Triton X-100 i 0,001% barwnika fluorochromowego: 4,6-diaminoino-2-fenylindol (DAPI), a następnie sączono przez filtry nylonowe o wielkości porów 50 μm i przeprowadzono analizę poziomu DNA za pomocą cytometru przepływowego Partec CA II (Partec, Monachium, Niemcy) (Tomaszewska-Sowa 2010). W każdej próbie analizowano co najmniej 5000 jader, jako kontrolę zastosowano DNA pochodzące z liści rośliny haploidalnej rosnącej w kulturach *in vitro* na pożywce MS bez regulatorów wzrostu. Rośliny, z których izolowano DNA regenerowały na pożywkach o różnym składzie ilościowym i jakościowym pod względem fitohormonalnym (Tabela 1).

Genomowe DNA izolowano z liści zdrowych, dorosłych roślin rosnących w warunkach polowych. 2 g tkanki homogenizowano w ciekłym azocie a izolację DNA wykonano metodą Davisa i in. (1986). Ilość i czystość otrzymanego DNA oceniono spektrofotometrycznie oraz na podstawie wyników elektroforezy przeprowadzonej

w 1% - żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Reakcję PCR-RAPD wykonano zmodyfikowaną metodą Williamsa i in. (1990). Wprowadzone zmiany dotyczyły obniżenia temperatury denaturacji z 94 do 92 stopni i wydłużenia tej fazy do 3 minut w pierwszym cyklu reakcji PCR oraz wydłużania do 7 min elongacji w ostatnim cyklu reakcji PCR. Amplifikację prowadzono w końcowej objętości 25 μl w termocyklerze (*Biometra Uno - Thermoblock*). W doświadczeniu wykorzystano 19 starterów (*Symbios, Polska*), (Tabela 2). Każdą reakcję powtórzono trzykrotnie. Rozdział produktów reakcji przeprowadzono w 2% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Wielkość otrzymanych produktów określono przy użyciu markera mas cząsteczkowych GeneRuler™ DNA Ladder Mix (*MBI Fermentas, Litwa*) oraz programu komputerowego GelAnalyzer 2010a (*gelanalyzer.com*). Dystans genetyczny między badanymi genotypami określono korzystając z formuły Nei i Li (1979). Dendrogram skonstruowano metodą UPGMA przy zastosowaniu programu komputerowego TREECON.

#### **WYNIKI I DYSKUSJA**

Burak cukrowy jest uznawany za gatunek trudno regenerujący w kulturach *in vitro*, jednakże jego duże znaczenie gospodarcze determinuje intensywny rozwój badań zmierzających do opracowania efektywnych metod pozyskiwania homozygotycznych roślin. Pomimo licznych prac eksperymentalnych procedura otrzymywania haploidów tego gatunku na drodze gynogenezy nadal

**Table 2.** Characteristics of RAPD primers used**Tablica 2.** Charakterystyka zastosowanych starterów RAPD.

Starter	Annealing temp. Temp. anilingu	Products Produkty (kpz)		Polymorphism of primers% Polimorfizm starterów %
		Monomorphic Monomorficzne	Polymorphic Polimorficzne	
P3 5'-GACAGACAGACAGACA-3'	47°C	0,76; 0,7; 0,54; 0,45; 0,37; 0,26;	0,76; 1,0	25
P13 5'-CGA GTG CCTA-3'	33°C	2,0; 1,6; 1,4; 1,1; 1,05; 0,88; 0,8; 0,61;		
P14 5'-CCA GCC GAA C-3'	38°C	1,9; 1,7; 1,5; 1,4; 1,2; 1,05; 1,0; 0,9; 0,85; 0,75; 0,65; 0,55; 0,43; 0,36; 0,33;	0,43	6,25
P15 5'-GGA AGC CAA C-3'	33°C	1,3; 1,1; 0,9; 0,81; 0,7; 0,65; 0,5; 0,39; 0,3; 0,28;		
P16 5'-CCA AGC TGC C-3'	38°C	1,4; 1,2; 1,1; 1,0; 0,85; 0,75; 0,65; 0,6; 0,55; 0,52; 0,44; 0,35;	0,52; 0,6	14,29
ARD2 5'-AGG GAA CGA G-3'	33°C	1,9; 1,5; 1,3; 1,1; 1,05; 1,0; 0,83; 0,78; 0,7; 0,64; 0,48;		
ARD3 5'-CCA CAG CAG T-3'	35°C	1,9; 1,7; 1,6; 1,5; 1,4; 1,3; 1,2; 1,1; 1,05; 1,0; 0,9; 0,77; 0,73; 0,62; 0,52; 0,47;	0,9; 1,0	11,11
ARD6 5'-CAA ACG TCG G-3'	34°C	2,3; 1,7; 1,6; 1,4; 1,1; 1,05; 0,95; 0,8; 0,75; 0,64; 0,56;		
ARD8 5'-GTT GCG ATC C-3'	34°C	1,9; 1,6; 1,5; 1,4; 1,25; 1,1; 0,95; 0,82; 0,78; 0,75; 0,71;		
ARD9 5'-ACC CCC GAA G-3'	38°C	1,7; 1,5; 1,45; 1,4; 1,25; 1,1; 1,05; 1,0; 0,92; 0,82; 0,56; 0,54;		
ARD11 5'-CAC ACT CCA G-3'	31°C	1,4; 1,2; 1,1; 1,05; 1,0; 0,6; 0,51; 0,49; 0,37;		
ARD14 5'-GTT GCC AGC C-3'	39°C	2,7; 2,1; 1,6; 1,4; 1,2; 1,05; 0,95; 0,85; 0,78; 0,72; 0,65; 0,58; 0,54;	1,05; 1,2	13,13
ARD20 5'-ACC CGG TCA C-3'	39°C	2,1; 1,5; 1,2; 1,15; 1,1; 1,05; 1,0; 0,9;		
ARK5 5'-TCT GTG CTG G-3'	34°C	1,3; 1,2; 1,03; 0,95; 0,9;		
ARK7 5'-GTA GAC CCG T-3'	33°C	2,7; 2,0; 1,5; 1,45; 1,1; 1,0; 0,83; 0,76; 0,75; 0,7; 0,65; 0,6; 0,45; 0,36;	1,2	6,67
ARK10 5'-AGC GCC ATT G-3'	37°C	2,5; 2,0; 1,7; 1,4; 1,3; 1,1; 1,0; 0,88; 0,63; 0,55; 0,5; 0,35; 0,25;	1,1	1,14
RAPD1 5'-TCC TAC GCA C-3'	34°C	1,55; 1,25; 1,2; 1,1; 1,0; 0,89; 0,84; 0,74; 0,6; 0,45;	1,15	9,09
RAPD2 5'-ATG GAT CCG C-3'	35°C	2,8; 2,5; 2,2; 1,8; 1,6; 1,45; 1,4; 1,25; 1,1; 1,05; 0,95; 0,9; 0,78; 0,7; 0,54; 0,48; 0,46;	0,78	5,56
RAPD12 5'-GGG CTC ATA G-3'	30°C	1,25; 1,15; 1,05; 1,02; 0,91; 0,85; 0,84; 0,75; 0,62;		

wiąże się z wieloma ograniczeniami (Aflaki i in., 2018). Jak twierdzą Eujayl i in., 2016 procent otrzymanych tą drogą roślin, które uzyskują normalny pokrój, jest wciąż bardzo niski. W celu poprawy efektywności metody analizowanych jest wiele czynników kształtujących

odpowieź morfogenetyczną eksplantatu, w tym warunki kultury i zastosowane fitohormonów (Eujayl i in., 2016, Pazuki i in., 2018 a, Pazuki i in., 2018 b, Tomaszewska-Sowa, 2012). Reakcja eksplantatów na ww. czynniki jest jednak w dużej mierze zależna od genotypu, co stanowi

poważne utrudnienie w opracowaniu wydajnej metody umożliwiającej regenerację stabilnych genetycznie roślin o pożądanym cechach morfologicznych (Gürel i Gürel 2013; Aflaki i in. 2018). W związku z dużą zmiennością spotykaną wśród roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* istotnym etapem badań jest również ocena ich polimorfizmu. Jedną z najczęściej wykorzystywanych technik, pozwalających na ocenę stopnia zróżnicowania badanego materiału na poziomie molekularnym, jest analiza RAPD. Uzyskanie precyzyjnych wyników ułatwiających identyfikację polimorficznych zmian możliwe jest przy wykorzystaniu wystarczająco dużej puli starterów o wysokiej specyficzności oraz odpowiednio dostosowanej temperaturze komplementacji (Isabel i in., 1993; Rani i in., 1995; Shoyama i in., 1997). Technika ta jest z powodzeniem stosowana dla wielu gatunków roślin: do ujawnienia zróżnicowania somaklonalnego pomiędzy liniami pszenicy *Triticum aestivum* (Brown i in., 1993), do identyfikacji zarodków somatycznych brzoskwini *Prunus persica* (Hashmi i in., 1997), a także do oceny stabilności genetycznej w trakcie długotrwałej kultur *in vitro* krwawnika *Achillea millefolium* (Wallner i in., 1996) czy kultury ketmi szczawiowej *Hibiscus sabdariffa* L. (Govinden-Soulangue i in. 2010). Również w kulturach buraka cukrowego metodę RAPD stosowano w celu identyfikacji somaklonów pochodzących z różnych eksplantatów tkankowych (Munthali i in., 1996).

W przeprowadzonym doświadczeniu fragmenty DNA amplifikowano przy wykorzystaniu 19 starterów, przy czym każdą z reakcji powtórzono trzykrotnie. Wyniki eksperymentu wykazały, iż 10 spośród badanych starterów amplifikuje te same fragmenty DNA we wszystkich badanych próbach (Tabela 2), podczas gdy pozostałych 9 generuje polimorficzne prążki.

Procent polimorfizmu dla tych starterów wynosił od 1,14% do 25%. Munthali i in. (1996) analizując próbki DNA ze 120 zregenerowanych roślin buraka za pomocą 5,607 sekwencji RAPD zidentyfikowali tylko 3 polimorficzne fragmenty. Także 9 spośród 11 starterów RAPD wykorzystanych przez Wiśniewska (2006) do molekularnej analizy regenerantów uzyskanych z

protoplastów szparkowych buraka, wykazało wyraźny polimorfizm pomiędzy dwiema badanymi liniami. Nie stwierdzono natomiast polimorficznych produktów obrębie roślin tego samego genotypu.

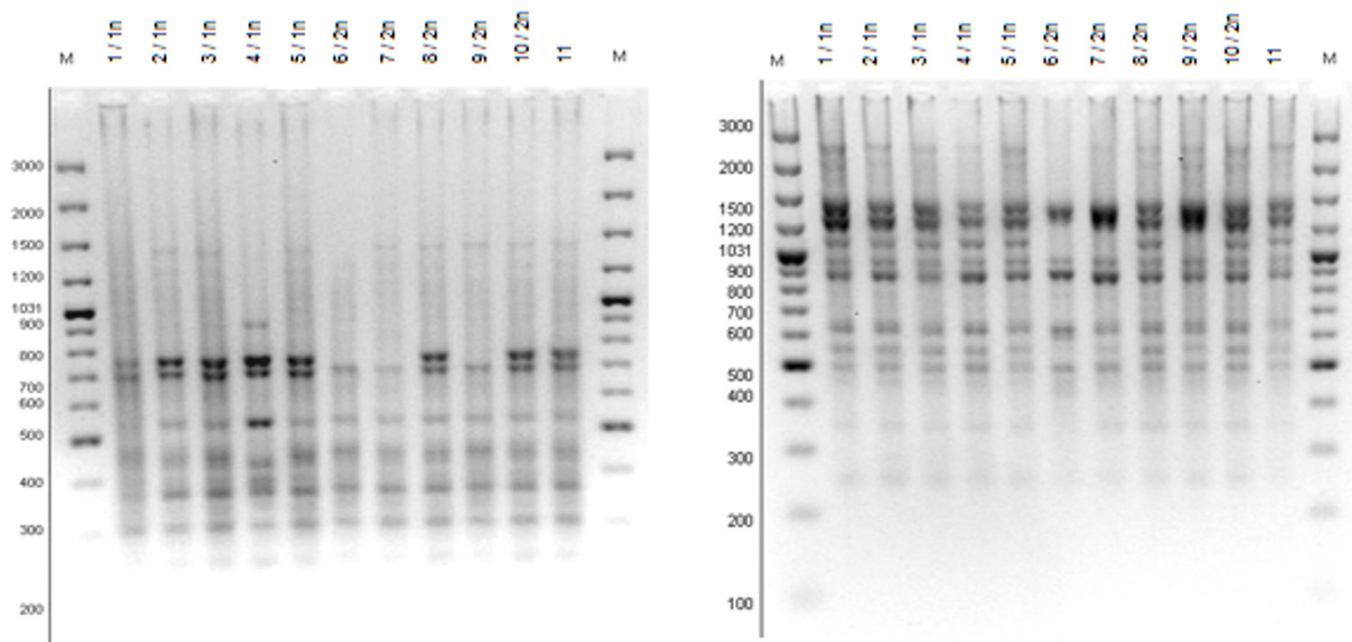
W przeprowadzonym doświadczeniu zidentyfikowano 13 prążków polimorficznych, z czego 11 wykryto wyłącznie w DNA diploidów, 1 w roślinie haploidalnej, natomiast 1 obecny był zarówno w DNA rośliny haploidalnej jak i diploidalnej (Tabela 3). Wśród ujawnionych zmian sekwencji DNA aż 10 polegało na braku amplifikacji fragmentów, a 3 na pojawieniu się dodatkowych prążków w porównaniu do genotypu kontrolnego. Największą zmienność wykazano dla DNA rośliny diploidalnej oznaczonej numerem 6, zregenerowanej na pożywce zawierającej 4,4  $\mu\text{M}$  BAP, dla której wykryto aż 10 polimorficznych miejsc. Na pożywkach uzupełnionych 4,4  $\mu\text{M}$  BAP i 0,44  $\mu\text{M}$  NAA oraz 4,4  $\mu\text{M}$  KIN i 0,44  $\mu\text{M}$  2,4-D uzyskano pędy charakteryzujące się 8 zmianami sekwencji w obrębie DNA, przy czym modyfikacje te były podobne dla obydwu roślin: 7 i 9 (Figura 1). W przypadku rośliny 8 uzyskanej na pożywce z 4,4  $\mu\text{M}$  KIN i 0,44  $\mu\text{M}$  NAA zidentyfikowano tylko 2 polimorficzne prążki. W DNA pędów powstałych w obecności 1,0  $\mu\text{M}$  TDZ i 1,0  $\mu\text{M}$  IBA zastosowane startery nie ujawniły obecności żadnych sekwencji polimorficznych. Wśród roślin haploidalnych polimorfizm wykryto tylko w przypadku regeneranta numer 4, uzyskanego na podłożu z 4,4  $\mu\text{M}$  KIN i 0,44  $\mu\text{M}$  2,4-D. Zastosowany starter P3 generował w przypadku tej rośliny produkt polimorficzny o wielkości 1kpz obecny jedynie dla tego regeneranta, nie stwierdzono natomiast prążka 0,52kpz który dla pozostałych haploidów otrzymano w wyniku reakcji ze starterem P16. W przeprowadzonym doświadczeniu większość z 30 wygenerowanych polimorficznych zmian dotyczyła diploidów, a tylko dwie pojawiły się u roślin haploidalnych (Tabela 3). Występowanie licznych, polimorficznych fragmentów DNA głównie wśród roślin o diploidalnej liczbie chromosomów pozwala stwierdzić, iż charakteryzują się one większą częstotliwością występowania zmienności somaklonalnej. Przyczyną tej zintensyfikowanej zmienności może być większa niestabilność materiału genetycznego w komórkach

**Table 3.** Polymorphism of DNA fragments obtained as a result of RAPD reactions.**Tablica 3.** Polimorfizm fragmentów DNA uzyskany w wyniku przeprowadzonych reakcji RAPD.

Starter	Monomorphic products (kpz) Monomorficzne produkty (kpz)	Polymorphic regenerates / ploidy Polimorficzne regeneranty / ploidalność									
		4 / 1n		6 / 2n		7 / 2n		8 / 2n		9 / 2n	
		Polymorphic products / Polimorficzne produkty – (M) Missing products, Brakujące produkty (A) Additional products, Dodatkowe produkty									
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A
P3	0,76;0,7; 0,54; 0,45; 0,37; 0,26;		1,0	0,76		0,76					0,76
P14	1,9; 1,7; 1,5; 1,4; 1,2; 1,05; 1,0; 0,9; 0,85; 0,75; 0,65; 0,55; 0,43; 0,36; 0,33;			0,43		0,43					0,43
P16	1,4; 1,2;1,1; 1,0; 0,85; 0,75; 0,65; 0,6; 0,55; 0,52; 0,44; 0,35;	0,52		0,6 0,52		0,6					0,6
ARD3	1,9; 1,7; 1,6; 1,5; 1,4; 1,3; 1,2; 1,1; 1,05; 1,0; 0,9; 0,77; 0,73; 0,62; 0,52; 0,47;			1,0 0,9		1,0					1,0
ARD14	2,7; 2,1; 1,6; 1,4; 1,2; 1,05; 0,95; 0,85; 0,78; 0,72; 0,65; 0,58; 0,54;			1,2				1,2 1,05			
ARK7	2,7; 2,0; 1,5; 1,45; 1,1; 1,0; 0,83; 0,76; 0,75; 0,7; 0,65; 0,6; 0,45; 0,36;				1,2		1,2				1,2
ARK10	2,5; 2,0; 1,7; 1,4; 1,3; 1,1; 1,0; 0,88; 0,63; 0,55; 0,5; 0,35; 0,25;			1,1		1,1					1,1
Rapd1	1,55; 1,25; 1,2; 1,1; 1,0; 0,89; 0,84; 0,74; 0,6; 0,45;						1,15				1,15
Rapd2	2,8; 2,5; 2,2; 1,8; 1,6; 1,45; 1,4; 1,25; 1,1; 1,05; 0,95; 0,9; 0,78; 0,7; 0,54; 0,48; 0,46;			0,78		0,78					0,78

diploidów, związana z samorzutną diploidyzacją zachodzącą w trakcie kultury. Występowanie wśród roślin diploidalnych zmienności charakteryzującej się większą częstotliwością potwierdzili także Veilleux i in. (1995) w trakcie badań nad roślinami pomidora zregenerowanymi w kulturach pylników. Analiza molekularna regenerantów o różnym stopniu ploidalności wśród roślin tulipanowca amerykańskiego wyszczególniła różnice polimorficzne pomiędzy badanymi haploidami, diploidami, tetraploidami i aneuploidami (Kiss i in., 2001). Zróżnicowanie w poziomie zmienności molekularnej zaobserwowano również w przypadku roślin brzoskwini. Ocena komórek pąków pochodzących z jednego drzewa, będących haploidami

i powstającymi samorzutnie dihaploidami ujawniła widoczny polimorfizm, umożliwiający jednoznaczne odróżnienie identycznych fenotypowo struktur (Pooler i Scorza, 1995). Szacowanie dystansu genetycznej między genotypami pozwala na ustalenie podobieństw genetycznych występujących między nimi. Na podstawie przeprowadzonych analiz obliczono współczynniki dystansu genetycznego, które dla ocenianych genotypów buraka przyjmowały wartości od 0 do 0,024 co wskazywało na ich bliskie pokrewieństwo (Tabela 4). Skonstruowano także dendrogram ilustrujący stopień zróżnicowania genetycznego między regenerantami (Figura 2).



**Figure 1.** Genetic analysis of plants regenerated from sugar beet germs using polymorphic RAPD primers: P3 (A), ARK10 (B); 1-10 regenerants (1n- haploid plants, 2n diploid plants), 11- control

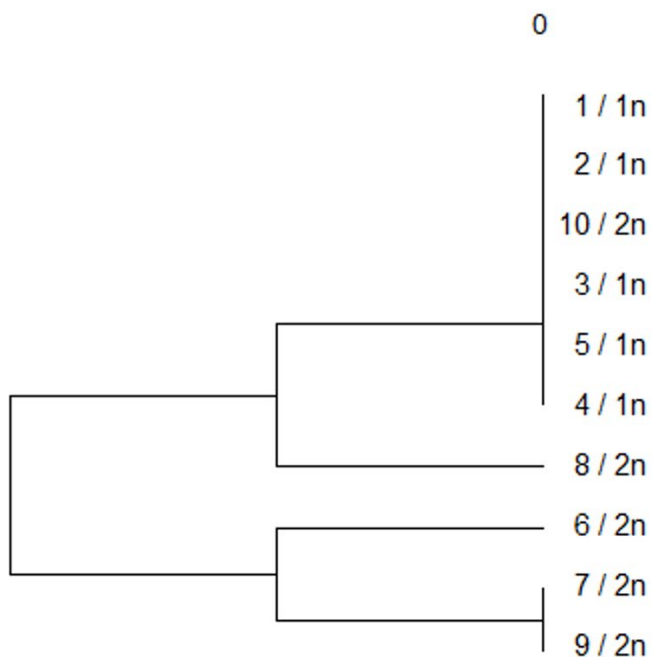
**Figura 1.** Analiza genetyczna roślin zregenerowanych z załóżków buraka cukrowego wykonana przy użyciu polimorficznych start-erów RAPD: P3 (A), ARK10 (B); 1-10 regeneranty (1n – haploidy, 2n – diploidy), 11- kontrola

**Table 4.** Distance coefficients obtained for gynogenetic regenerants of sugar beet *Beta vulgaris* L.

**Tablica 4.** Współczynniki dystansu genetycznego uzyskany dla gynogenicznych regenerantów buraka cukrowego *Beta vulgaris* L

Genotyp Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0.000	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0.000	0.000	0.000	-	-	-	-	-	-	-
4	0,005	0,005	0,005	0.000	-	-	-	-	-	-
5	0.000	0.000	0.000	0,005	0.000	-	-	-	-	-
6	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0.000	-	-	-	-
7	0,019	0,019	0,019	0,024	0,019	0,010	0.000	-	-	-
8	0,005	0,005	0,005	0,001	0,005	0,024	0,024	0.000	-	-
9	0,019	0,019	0,019	0,024	0,019	0,010	0.000	0,024	0.000	-
10	0.000	0.000	0.000	0,005	0.000	0,024	0,019	0,005	0,019	0.000





**Figure 2.** Dendrogram by UPGMA cluster analysis for plants obtained from unfertilized ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

**Figura 2.** Dendrogram uzyskany metodą UPGMA dla roślin zregenerowanych z niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego *Beta vulgaris* L.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyodrębnienie diploidalnych genotypów 6 i 8, nie stwierdzono różnic między diploidami oznaczonymi numerami 7 i 9, natomiast roślina diploidalna z numerem 10 stanowiła jednorodną grupę z otrzymanymi w doświadczeniu haploidami 1-5.

## PODSUMOWANIE

W związku z dużą zmiennością występująca wśród roślin regenerujących w kulturach *in vitro* dokonano oceny polimorfizmu gynogenicznych regenerantów charakteryzujących się różnym stopniem ploidalności. Stwierdzono ujawnienie się efektu polimorfizmu głównie wśród roślin diploidalnych, co sugeruje że diploidy charakteryzuje większa zmienność somaklonalną w porównaniu do roślin haploidalnych. Przedstawione powyżej wyniki są podstawą do przeprowadzenia dalszych badań nad procesami regeneracji roślin z eksplantatów zalążków, głównie w zakresie wyeliminowania pojawiającej się w kulturach *in vitro* zmienności oraz w celu ułatwienia identyfikacji drogi rozwojowej różnicujących się struktur.

## LITERATURA

- Aflaki, F., Pazuki, A., Gürel, S., Stevanato, P., Biancardi, E., Gürel, E. (2017) Doubled haploid sugar beet: an integrated view of factors influencing the processes of gynogenesis and chromosome doubling. *International Sugar Journal*, 119, 884-895.
- Brown, P. T. H., Lange, F. D., Kranz E., Lörz, H. (1993) Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Molecular and General Genetics*, 237, 311-317.
- Davis, L. G., Dübner, M. D., Leder, J.F. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science, 42-43.
- Doctrinal, M., Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B. S. (1989) *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17, 1-12.
- Doctrinal, M., Sangwan, R. S., Sangwan-Norreel, B. S. (1990) Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): *In vitro* induction of haploids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Haploids in Crop Improvement*, 12, 346-357.
- Driessen, S., Pohl, M., Bartsch, D. (2001) RAPD-PCR analysis of the genetic origin of sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) at Germany's Baltic Sea coast. *Basic and Applied Ecology*, 2, 341-349. DOI: <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00061>
- Eujayl, I., Strausbaugh, C., Lu, C. (2016) Registration of sugarbeet doubled haploid line KDH13 with resistance to beet curly top. *Journal of Plant Registrations*, 10, 93-96. DOI: <https://doi.org/10.3198/jpr2015.09.0055crs>
- Goška, M. (1997) Haploidy i podwojone haploidy buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz możliwości ich wykorzystania w hodowli. *Monografie i rozprawy naukowe Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Nr 2*.
- Govinden-Soulangue, J., Somanah, D., Ranghoo-Sanmukhiya, M., Boodia, N., Rajkomar, B. (2010) Detection of somaclonal variation in micropropagated *Hibiscus sabdariffa* L. using RAPD markers. *University of Mauritius Research Journal*, 16, 435-447.
- Gürel, S., Gürel, E. (2013) *In vitro* regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: Ramawat K.G., Merillon J.M. (eds) *Bulbous Plants: Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 113-151.
- Gürel, S., Gürel, E., Kaya, Z. (2000) Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports*, 19, 1155-1159. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990000248>
- Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L., Hammerschlag, F. (1997) RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, 16/9, 624-627. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01275503>
- Hosemans, D., Bossoutrot, D. (1983) Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung*, 91, 74-77.
- Hosemans, D., Bossoutrot, D. (1985) *In vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.) ovules of male sterile and male fertile plants and induction of haploid plants. In: *Experimental Manipulation of Ovule Tissues*. Plant Science. Chapman, G. P., Mantell, S. H., Daniels, R. W. Longman. New York, 79-88.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, M., Bousguet, J. (1993) RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 81-87. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00223811>

- Jażdżewska, E., Sadoch, Z., Niklas, A., Majewska-Sawka, A. (2000) Plant regeneration from sugar beet leaf protoplasts: analysis of shoots by DNA fingerprinting and restriction fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Botany*, 78, 10-18. DOI: <https://doi.org/10.1139/b99-145>
- Kiss, J., Kondrák, M., Törjék, O., Kiss, E., Gyulai, G., Mázik-Tökei, K., Heszky, L.E. (2001) Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica*, 18, 213-221. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004014601267>
- Lenzner, S., Zoglauer, K., Schieder, O. (1995) Plant regeneration from protoplasts of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum*, 94, 342-350. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05321.x>
- Lux, H., Herrmann, L., Wetzler, C. (1990) Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breeding*, 104, 177-183. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1990.tb00420.x>
- McGrath, M., Derrico, C. A., Yu, Y. (1999) Genetic diversity in selected, historical US sugarbeet germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 968-976. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051157>
- Munthali, M. T., Newbury, H. J., Ford - Lloyd, B. V. (1996) The detection of somaclonal variants of beets using RAPD. *Plant Cell Reports*, 15, 474-478. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00232977>
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nei, M., Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5269-5273.
- Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, E., Ergül, A., Gürel, S. (2018a) Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment. *Sugar Tech*, 20 (1), 69-77. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0522-x>
- Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, S., Ergül, A., Gürel, E. (2018b) Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 132, 85-97. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1313-5>
- Pooler, M. R., Scorza, R. (1995) Aberrant transmission of RAPD markers in haploids, doubled haploids, and F<sub>1</sub> hybrids of peach: observations and speculation on causes. *Scientia Horticulturae*, 64, 233-241. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(95\)00846-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00846-2)
- Rani, V., Parida, A., Raina, S. N. (1995) Random amplified polymorphic DANN (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports*, 14, 459-462. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00234055>
- Sadoch, Z., Goc, A., Wierzchoślawski, R., Dalke, L. (2003) Cytoplasmic male sterility in hybrids of sterile wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) and O - type fertile sugar beet (*Beta vulgaris* L.): molecular analysis of mitochondrial and nuclear genomes. *Molecular Breeding*, 11, 137-148. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022450430434>
- Shen, Y., Newbury, H. J., Ford - Lloyd, B. V. (1996) The taxonomic characterization of annual *Beta* germplasm in a genetic resources collection using RAPD markers. *Euphytica*, 91, 205-212. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00021071>
- Shoyama, Y., Zhu, X. X., Nakai, R., Shiraiishi, S. (1997). Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports*, 16, 450-453. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01092764>
- Tomaszewska-Sowa, M. (2010) Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured *in vitro*. *EJPAU*, 13/4.
- Tomaszewska-Sowa, M. (2012) Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in unfertilised ovule *in vitro* cultures. *Acta Agrobotanica*, 65, 91-100. DOI: <https://doi.org/10.5586/aa.2012.025>
- Van Geyt, J., Spockmann, Jr. G. J., Halluin, K. D., Jacobs, M. (1987) *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 73, 920-925.
- Veilleux, R. E., Shen, L. Y., Paz, M. M. (1995) Analysis of the genetic composition of anther - derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome*, 38, 1153-1162. DOI: <https://doi.org/10.1139/g95-153>
- Wallner, E., Weising, K., Rompf, R., Kahl, G., Kopp, B. (1996) Oligonucleotide fingerprinting and RAPD analysis of *Achillea* species: Characterization and long-term monitoring of micropropagated clones. *Plant Cell Reports*, 15, 647-65. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00232470>
- Wang, S., Hang, A., Tsuchiya, T. (1991) Chromosome studies of callus tissues and regenerated plants from an unfertilized ovule culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Genetics and Breeding*, 45, 161-168.
- Weich, E.W., Levall, M.W. (2003) Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I., eds. *Doubled haploid production in crop plants*. Berlin: Springer, 255-263.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Wiśniewska, E. (2006) Charakterystyka cytologiczna i genetyczna komórek o wysokim i niskim potencjale do regeneracji roślin *in vitro* (*Nicotiana tabacum* L. vs *Beta vulgaris* L.). Praca doktorska. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy.
- Yang, H.Y., Zhou, C. (1982) *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theoretical and Applied Genetics*, 63, 97-104. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00303687>
- Yu, M.H. (1992) Growth and reproduction performance of ovule - induced sugarbeet plants. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 24 (1), 47-55.