

**Ocena zdrowotności, wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń
mikrobiologicznych oraz ocena czystości odmianowej i tożsamości genetycznej
roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku
na etapie izolacji eksplantatów inicjalnych i stabilizacji
kultur *in vitro***

Opracowanie zbiorowe pod redakcją: dr hab. Eleonora Gabryszewska, prof. IO,
dr Agnieszka Wojtania

Autorzy opracowania:

prof. dr hab. K. Górecka, prof. dr hab. T. Orlikowska, dr hab. M. Cieślińska, prof. IO, dr hab.
E. Gabryszewska, prof. IO, dr hab. M. Podwyszyńska, prof. IO, dr J. Góraj-Koniarska, dr W. Kiszczak, dr
T. Malinowski, dr I. Sowik, dr A. Wojtania, mgr A. Kapuścińska, mgr U. Kowalska, mgr M. Markiewicz,
mgr K. Nowak, mgr A. Trzewik

Opracowanie przygotowane w ramach

zadania 1.5:

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

Programu Wieloletniego:

**„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego
z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska
naturalnego”**

Skierniewice 2015

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Gatunki i odmiany roślin ogrodniczych, na których prowadzone są badania
4. Ocena zdrowotności pod względem obecności patogenicznych wirusów materiału roślinnego truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku przed zainicjowaniem kultur *in vitro*
5. Izolacja eksplantatów inicjalnych i stabilizacji kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku
6. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie inicjowania i podczas stabilizacji kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku
7. Ocena wzrostu i rozwoju roślin jagody kamczackiej oraz kondycji fizjologicznej podczas stabilizacji kultur *in vitro*
8. Ocena tożsamości genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku przed zainicjowaniem kultur *in vitro*
9. Podsumowanie i wnioski
10. Literatura
11. Zespół badawczy

1. Wstęp

Rozmnażanie roślin metodą *in vitro* jest alternatywną technologią rozmnażania w produkcji ogrodniczej. Metoda ta wykorzystywana jest w produkcji elitarnego (przedbazowego i bazowego) materiału szkółkarskiego roślin sadowniczych, który z kolei służy do zakładania mateczników i produkcji kwalifikowanego materiału szkółkarskiego wolnego od patogenów. Według danych szacunkowych, zbyt wiele plantacji jest zakładanych z niekwalifikowanych sadzonek, co wpływa na obniżenie plonu i pogorszenie jego jakości oraz zwiększenie kosztów produkcji. Techniki *in vitro* wykorzystywane są także w pracach hodowlanych oraz w masowej produkcji ogrodniczej w Polsce.

Polska jest ważnym – w skali globalnej – producentem owoców jagodowych. Obecnie uprawą roślin jagodowych w Polsce zajmuje się około 200 tys. przeważnie małych gospodarstw. Areał uprawy owoców jagodowych wynosi 133 tys. ha, co stanowi 31% powierzchni upraw owocowych. Zbiory owoców jagodowych w Polsce w latach 2010-2012 średnio wyniosły 535 tys. ton (16% zbiorów owoców ogółem), a ich produkcja systematycznie rośnie. W wymienionym wyżej okresie produkcja truskawek wynosiła 157 tys. ton, natomiast maliny 113 tys. ton (Kraciński, 2014). Nie ma danych o produkcji owoców jagody kamczackiej, ponieważ gatunek ten w uprawie sadowniczej w Polsce jest rozpowszechniany zaledwie od kilku lat. Wysoka odporność na mróz (do -40°C), wysoka odporność na szkodniki i choroby oraz wczesna wegetacja i zbiór owoców (na przełomie maja i czerwca), małe wymagania glebowe i niskie koszty produkcji sprawiają, że jagoda kamczacka cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród profesjonalnych sadowników i działkowców. Metoda mnożenia *in vitro* tego gatunku jest bardzo ważna dla zakładania wydajnych mateczników połowych, a także pozwala na szybkie wprowadzenie do uprawy nowych odmian. Liderem produkcji czosnku w Europie jest Hiszpania (140 tys. ton). Produkcja roczna czosnku w Polsce wynosi ok. 15-20 tys. ton (z powierzchni około 3 tys. ha). Główne obszary produkcji czosnku w Polsce to okolice Warszawy (Nowy Dwór, Błonie, Ożarów), Zamościa, Zielonej Góry i Poznania (<http://www.fresh-market.pl>). Do tej pory nie opracowano i nie wprowadzono systemu umożliwiającego produkcję cebul czosnku o wysokiej jakości.

W ostatnich latach, coraz częściej wymagane są certyfikaty jakości i zdrowotności mikrosadzonek (mikrocebul) produkowanych w krajowych laboratoriach, szczególnie przy sprzedaży materiału rozmnożeniowego do USA i państw Unii Europejskiej. Poza zdrowotnością materiału istotnym czynnikiem decydującym o jego jakości jest tożsamość genetyczna rozmnażanych metoda *in vitro* gatunków i odmian roślin ogrodniczych.

2. Cel badań

Celem badań było opracowanie systemu oceny zdrowotności, tożsamości genetycznej i kondycji fizjologicznej wybranych roślin ogrodniczych (truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku) na etapach inicjacji i stabilizacji kultur *in vitro*.

3. Gatunki i odmiany roślin ogrodniczych, na których prowadzone są badania

Badania prowadzono na następujących gatunkach i odmianach roślin ogrodniczych:

Truskawka (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), odmiany 'Grandarosa' i 'Selva'

Malina (*Rubus idaeus* L.), odmiany 'Polka' i 'Polana'

Jagoda kamczacka (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest), odmiany 'Wojtek' i 'Zojka'

Czosnek pospolity (*Alium sativum* L.), odmiany 'Ornak' i 'Jarus'

4. Ocena zdrowotności materiału roślinnego truskawki, maliny, jagody kaczackiej oraz czosnku przed zainicjowaniem kultur *in vitro* pod względem obecności wirusów

Ocena zdrowotności dotyczyła roślin matecznych truskawki, maliny, jagody kaczackiej oraz czosnku, z których inicjowano kultury wyjściowe (Tab. 1, Zdj. 1, 2 i 3).

Tabela 1. Wykaz badanych wirusów i metody ich wykrywania

Gatunek	Wykaz badanych wirusów	Metody wykrywania wirusów	Wykryte wirusy
Malina 'Polka' 'Polana'	RBDV*, RLBV, RLMV, RVCV	Testy DAS-ELISA Technika RT-PCR	Nie stwierdzono obecności wirusów
Truskawka 'Grandarosa' 'Selva'	SMoV, SCrV, SMYEV, SVBV	Metoda biologiczna (rośliny wskaznikowe <i>Fragaria vesca</i> i <i>Fragaria virginiana</i>) Technika RT-PCR	SMoV SMYEV u odmiany 'Grandarosa' SMoV u odmiany 'Selva'
Czosnek pospolity 'Ornak' 'Jarus'	OYDV, LYSV, SLV, GCLV, GarV-X, ShV-X, GarV-A, GarV-B, GarV-C, GarV-D, GarMbmV, IYSV, GYSV	Technika RT-PCR	LYSV i SLV w roślinach odmiany 'Ornak' i 'Jarus' oraz GCLV w roślinach odmiany 'Jarus'
Jagoda kaczacka 'Zojka'	Brak danych o chorobach wirusowych u tego gatunku	Analiza profilu sRNA metodą next generation sequencing, NGS (wysokowydajne sekwencjonowanie)	Nie stwierdzono obecności wirusów w roślinie matecznej odmiany 'Zojka'

*

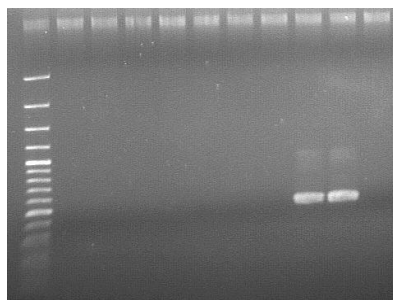
RBDV (*Raspberry bushy dwarf virus*), RLBV (*Raspberry leaf blotch virus*), RLMV (*Raspberry leaf mottle virus*), RVCV (*Raspberry vein chlorosis virus*)
SMoV (*Strawberry mottle virus*), SCrV (*Strawberry crinkle virus*), SMYEV (*Strawberry mild yellow edge virus*), SVBV (*Strawberry vein banding virus*)
OYDV (*Onion yellow dwarf virus*), LYSV (*Leek yellow stripe virus*)
SLV (*Shallot latent virus*)
GCLV (*Garlic common latent virus*)
GarV-X (*Garlic virus X*), ShV-X (*Shallot virus X*), GarV-A (*Garlic virus A*), GarV-B (*Garlic virus B*), GarV-C (*Garlic virus C*), GarV-D (*Garlic virus D*), GarMbmV (*Garlic mite-borne mosaic virus*), IYSV (*Iris yellow spot virus*), GYSV (*Garlic yellow streak virus*)
GCLV (*Garlic common latent virus*)



Zdjęcie 1. Objawy wywołane przez wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*, SMoV) na roślinie wskaźnikowej *Fragaria vesca* 'Alpine'

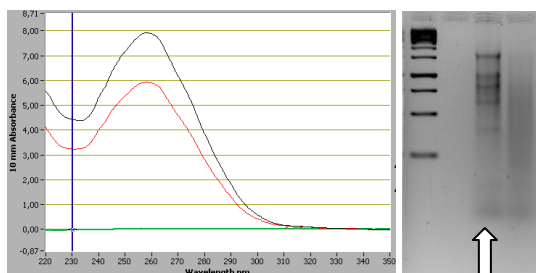
Zdjęcie M. Cieślińska

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Zdjęcie 2. Wyniki testu RT-PCR na obecność wirusa marszczycy truskawki (*Strawberry crinkle virus*, SCrV) (ścieżki 1-5) i wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*, SMOV) (ścieżki 6-10). Prążki w żelu uwidoczniają produkty reakcji dla prób 'Grandarosa' 4/10 i 5/4.

Zdjęcie: M. Cieślińska



Zdjęcie 3. Widmo absorpcji UV oraz rozdział elektroforetyczny preparatów całkowitego RNA izolowanego z jagody kamczackiej odmiany 'Zojka'. Do wysokowydajnego sekwencjonowania przekazano jeden z uzyskanych preparatów charakteryzujący się prawidłowym profilem elektroforetycznym (na zdjęciu wskazany strzałką).

Zdjęcie: T. Malinowski

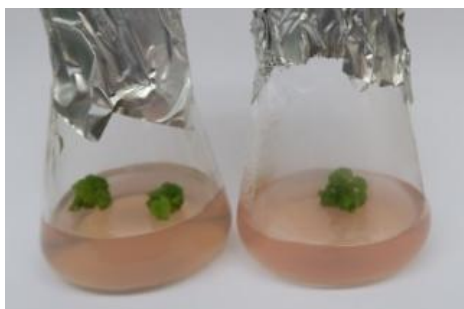
5. Izolacja eksplantatów inicjalnych i stabilizacja kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku

Opracowano metody efektywnej inicjacji i stabilizacji kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku (Tab.2, Zdj. 4, 5, 6 i 7).

Tabela 2 Izolacja i regeneracja *in vitro* eksplantatów inicjalnych truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku

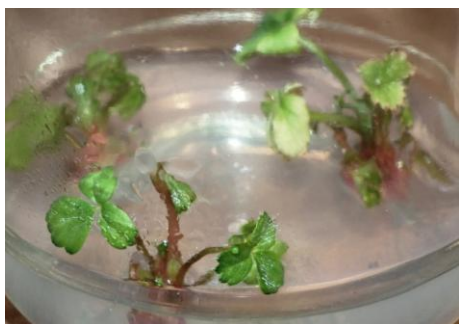
Gatunek Odmiana	Rodzaj i liczba eksplantatów inicjalnych (liczba)	Metody i środki stosowane do odkażania eksplantatów wyjściowych	Pożywka podstawowa i regulatory wzrostu	Regeneracja eksplantatów inicjalnych
Malina 'Polka' 'Polana'	Pąki wierzchołkowe i boczne pędów z uprawy polowej (385)	Sposób odkażania: a/Płukanie w wodzie bieżącej (2h), wytężanie w roztworze detergentu (5 min) b/ 70% etanolu (kilka sekund) c/0,1% HgCl ₂ (3 min) lub 2% roztworze PGM (5 min) d/ Trzykrotne płukanie w wodzie sterylnej po 5 min.	Zmodyfikowana pożywka Murashige i Skooga (1962) - MS) -1/2 zawartości soli mineralnych, witaminy wg pożywki Lloyd i McCown (1978) - WPM BAP 0,5 mg l ⁻¹ oraz BAP 0,6 mg l ⁻¹ +IBA 0,1 mg l ⁻¹	Otrzymano kultury z pędów bocznych odmiany 'Polana'. Wszystkie eksplantaty odmiany 'Polka' zamarły.

Truskawka 'Grandarosa' 'Selva'	Pąki wierzchołkowe rozłogów (82)	Sposób odkażania: a/Płukanie pod bieżącą wodą (2h) b/ 70% etanolu (30 sek.) c/ 15% Clorox (z dodatkiem Tween) d/ 3-krotne płukanie fragmentów roślin w sterylnej wodzie (10min) Materiał roślinny pobrany z pola był sterylizowany w 0,1% roztworze HgCl ₂	Pożywka podstawowa wg Boxusa (1974), makroelementy – wg Knopa (1865), mikroelementy i witaminy – wg Murashige i Skooga (1962) - MS, IBA 1,0 mg l ⁻¹ +BAP 0,1 mg l ⁻¹ + GA ₃ 0,1 mg l ⁻¹	Rozwój pędów bocznych u obydwu odmian. Nie stwierdzono regeneracji pędów przybyszowych.
Jagoda kanczacka 'Zojka' 'Wojtek'	Pąki wierzchołkowe i/lub boczne pędów z roślin ze szklarni (126)	Sposób odkażania: a/ Ace (5 ml Ace/100 sterylnej wody destylowanej) przez okres 20 min. (wyrząsarka - 90 obr./min) b/ 0,1% roztworze HgCl ₂ (kilka sek.)	Zmodyfikowana pożywka Murashige i Skooga (1962) - MS 2iP 15 mg l ⁻¹ + m -Topolina 1 mg l ⁻¹	Rozwój pędów bocznych u obydwu odmian. Większa dynamika wzrostu <i>in vitro</i> odmiany 'Zojka'.
Czosnek pospolity 'Ornak' 'Jarus'	Fragmenty łusek z merystemem i częścią piętki (74)	3 metody odkażania eksplantatów: I/ 2 godziny w wodnym roztworze 5% PPM, 3 krotne płukanie w wodzie sterylnej. II/ 10 min w 5% CaClO ₂ (Tween 20), 3 krotne płukano sterylną wodą III/ 2 min traktowania 70% etanolem a następnie postępowanie jak w drugiej metodzie.	Pożywka B5 Gamborga (1968) kinetyna 10 mg l ⁻¹ +NAA 0,1 mg l ⁻¹	Regeneracja następujących struktur: rozeta z piętka, fragment liścia z piętka, formująca się rozeta z piętka, zączątki rozet z piętka.



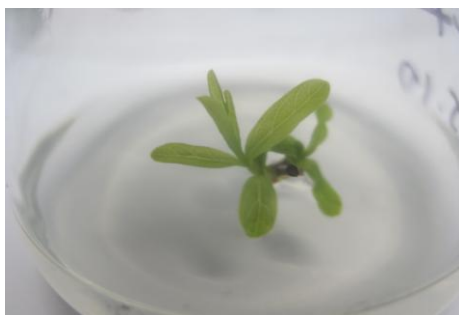
Zdjęcie 4. Kultury maliny 'Polana' po 14 tygodniach od zainicjowania

Zdjęcie: K. Nowak



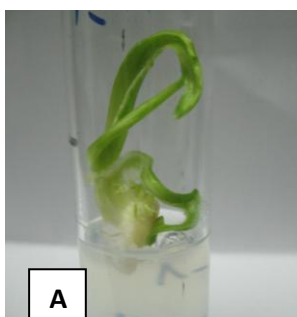
Zdjęcie 5. Pędy truskawki 'Grandarosa' po trzecim pasażu w kulturach *in vitro* (w trzecim tygodniu po przeniesieniu na świeżą pożywkę)

Zdjęcie: I. Sowik

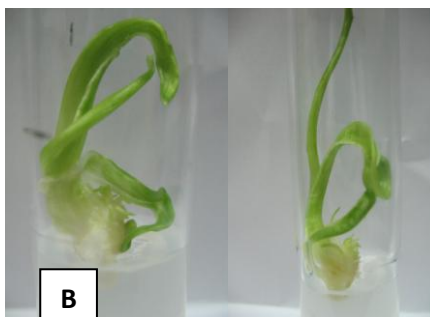


Zdjęcie 6. Regeneracja *in vitro* pędów jagody kamczackiej 'Zojka' z izolowanych pąków bocznych

Zdjęcie: E. Gabryszewska



A



B



C



D



E

Zdjęcie 7. Regeneracja i wzrost czosnku *in vitro*

- A - rozeta ukorzeniająca się
- B - rozety nieukorzone z piętka
- C - rozeta z zaczątkami nowych rozet
- D - zaczątki rozet
- E - zaczątki rozet z piętka

Zdjęcia: U. Kowalska

6. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie inicjowania i podczas stabilizacji kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku

Proces wykrywania zanieczyszczeń mikroorganizmami na etapie inicjacji i stabilizacji kultur przebiega w następujący sposób:

- 1/ Ocena obecności zanieczyszczeń grzybowych, usuwanie zanieczyszczonych kultur
- 2/ Ocena obecności zanieczyszczeń bakteryjnych, opis morfologii kolonii, usuwanie kultur zanieczyszczonych; izolowanie zanieczyszczeń bakteryjnych z kultur stabilizujących się i wyprowadzanie czystych izolatów z zanieczyszczeń kultur na etapie stabilizacji
- 3/ Charakterystyka izolatów (ocena morfologii i barwy kolonii, gramowość i zdolność do fluorescencji)

4/ Oznaczenie odporności izolatów na antybiotyki

I. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w stadium inicjalnym truskawki, maliny i czosnku

Malina (*Rubus idaeus* L.)

Pomimo identycznego sposobu odkażania i pobierania pąków z tego samego stanowiska polowego roślin donorowych, odmiana 'Polka' była bardziej zanieczyszczona bakteriami. Bakterie w odmianie 'Polana' znajdowano głównie w pąkach odkażanych PGM (26:6), natomiast w odmianie 'Polka' w pąkach odkażanych PGM oraz HgCl₂ (22:18). Większość stanowiły bakterie Gram + : 22:9 w odmianie 'Polana' i 25:15 w odmianie 'Polka'. Na podstawie cech morfologicznych do rodzaju oznaczono 19 izolatów (*Actinomycetes* – 15, *Methylobacterium* – 3, *Bacillus* – 1, *Pseudomonas* – 1). Nie zaobserwowano pozytywnego wpływu ujawniających się bakterii na dobrostan pędów, więc żadna nie należała do grupy pożytecznych (Tab. 3).

Tabela 3. Wstępna charakterystyka izolatów bakteryjnych z kultur inicjalnych maliny

Izolaty bakteryjne z maliny		'Polana'		'Polka'	
Liczba uzyskanych izolatów		35		49	
Sposób odkażania		PGM	HgCl ₂	PGM	HgCl ₂
Barwienie Grama 3% KOH	Gram +	19	3	13	12
	Gram -	7	3	9	6
Kształt kom. bakt.	sferyczne			2	1
	cylindryczne	9	2	6	6
Kolor kolonii	fluoryzujące	1			
	różowe	1		2	1
	pomarańczowe			2	1
	żółte	14	3	10	10
	białe	1			1
	kremowe	13	7	8	9
Typowany rodzaj	<i>Pseudomonas</i>	1			
	<i>Actinomycetes</i>	5	1	1	6
	<i>Methylobacterium</i>	1		2	1
	<i>Bacillus</i>	1			
Razem przebadanych		26	6	22	18
Nie testowane		3	0	4	5



Zdjęcie 8. Wyciek bakterii do pożywki z eksplantatu maliny w okresie stabilizacji

Zdjęcie: K. Nowak

Truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch.)

26 izolatów bakteryjnych otrzymano z 23 eksplantatów inicjalnych, z czego 1 izolat nie wykazywał wzrostu na pożywkach mikrobiologicznych (26 'Selva'). Testy prowadzono na pozyskanych 25 szczepach bakteryjnych (eksplantaty 17 'Selva', 38 'Grandarosa' i 47 'Grandarosa' były zanieczyszczone dwoma bakteriami). Większość izolatów należało do bakterii gramujemnych (92,6%), tylko 2 szczepy były gramodatnie. Dziewięć izolatów przypisanych zostało do rodzaju *Pseudomonas*, natomiast jeden do *Methylobacterium* (Tab. 4).

Tabela 4. Wstępna charakterystyka bakterii wyizolowanych z kultur inicjalnych truskawki

Odmiana	Izolat	Kolor	Pigment. podłoża	Fluorescencja w UV	Gram +/- (3% KOH)	Typowany rodzaj	Uwagi
'Grandarosa	11 G	żółto-pom.			G(-)		
'Selva'	15 S	żółty			G(-)		
'Selva'	16 S	żółty			G(-)		jak 15 S
'Selva'	17 S A	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Selva'	17 S B	żółty			G(-)		
'Selva'	20 S	różowy			G(-)	<i>Methylobacterium</i>	
'Selva'	22 S	żółty			G(-)		
'Selva'	23 S	kremowy			G(+)		
'Selva'	26 S	brak wzrostu					
'Selva'	34 S	żółty			G(-)		jak 15 S
'Grandarosa	36 G	żółty			G(-)		
'Grandarosa	38 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	38 G	żółty			G(-)		
'Grandarosa	43 G	żółty			G(-)		
'Grandarosa	45 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	47 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	47 G	żółty			G(-)		jak 15 S
'Grandarosa	49 G	kremowy			G(+)		jak 23 S
'Grandarosa	50 G	żółty			G(-)		jak 15 S
'Grandarosa	54 G	żółty			G(-)		
'Selva'	57 S	żółty			G(-)		
'Grandarosa	68 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	69 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	73 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	75 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	
'Grandarosa	76 G	i. żółty	żółty	fluor.	G(-)	<i>Pseudomonas</i>	

Czosnek (*Allium sativum* L.)

Z kultur inicjalnych czosnku otrzymano 27 izolatów bakteryjnych : 13 z odmiany 'Ornak' i 14 z odmiany 'Jarus'.

Tabela 5. Obecność bakterii kulturach inicjalnych czosnku w zależności od sposobu sterylizacji wstępnej roślin

Odmiana czosnku	'Ornak'			'Jarus'		
barwienie	Gram +/- (3% KOH)			Gram +/- (3% KOH)		
sposób sterylizacji	G+	G-	razem	G+	G-	razem
I	1	1	2	5	2	7
II	1	4	5	4	1	5
III	4	2	6	2		2
razem	6	7	13	11	3	14

Tabela 6. Barwa kolonii bakteryjnych na agarze odżywczym

	Odmiana czosnku	
Barwa kolonii bakt.	'Ornak'	'Jarus'
inicjacja kultur in vitro		
brudnożółta	1	
j.żółta	3	3
żółta	1	1
biała		
kremowa	4	9
przejrzysta	3	
pomarańczowa	1	1
stabilizacja kultur in vitro		
brudnożółta		1
j.żółta	3	3
żółta	6	
biała	2	1
kremowa		2
przejrzysta		
pomarańczowa	4	

II. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych podczas stabilizacji kultur *in vitro* maliny, jagody kamczackiej i czosnku

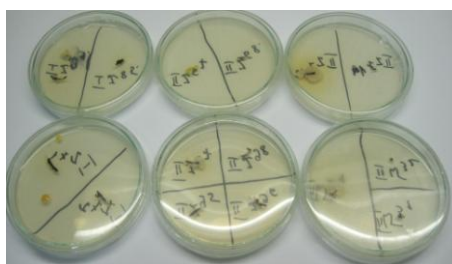
Podczas stabilizacji kultur eksplantaty czosnku, maliny i jagody kamczackiej były wykładane na pożywkę mikrobiologiczną Nutrient Agar (NA). W ciągu 2 tygodni inkubacji w 25°C obserwowano pojawianie się kolonii bakteryjnych na podłożu mikrobiologicznym lub mętnego „wycieku”, mogącego zawierać mikroorganizmy. Z każdej takiej próby, sugerującej obecność bakterii, pobierano wymaz w celu uzyskania czystego izolatu bakteryjnego.

Malina (*Rubus idaeus* L.)

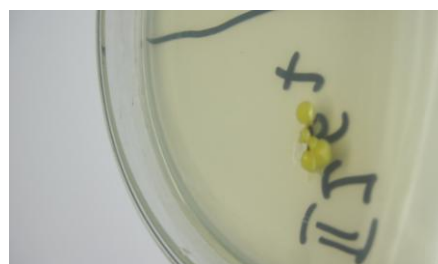
Z 9 eksplantatów odmiany ‘Polana’ uzyskano cztery izolaty bakterii, jednak tylko jeden charakteryzował się dobrym wzrostem na pożywkach. Pozostałe trzy były trudne w hodowli i nie zawsze następował ich wzrost niezależnie od stosowanego podłoża (przetestowano podłoża NA, Plant Counting Agar, Mueller-Hinton Agar, Tryptic Soy Agar, 523 i R2A), chociaż częściej obserwowany był rozwój bakterii na pożywce zawierającej cukier. Nie udało się też uzyskać żywych kultur, nawet z wyjściowych kolbek z pożywką stabilizacyjną dla kultur maliny (Tab. 7B).

Jagoda kamczacka (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.)

Z izolowanych 78 fragmentów pędów jagody kamczackiej, pozyskano jeden izolat bakterii z odmiany ‘Wojtek’ oraz sześć z odmiany ‘Zojka’ (łącznie 7 izolatów) (Tab. 7A).



Zdjęcie 9. Testowanie na obecność bakterii endogennych izolowanych fragmentów pędów jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' i 'Wojtek' rosnących *in vitro*
Zdjęcie: E. Gabryszewska



Zdjęcie 10. Wzrost bakterii na pożywce wokół izolowanego fragmentu pędu jagody kamczackiej odmiany 'Zojka'
Zdjęcie: E. Gabryszewska

Czosnek (*Allium sativum* L.)

Przed przeniesieniem eksplantatów wolnych od widocznych zanieczyszczeń bakteryjnych na pożywkę stabilizacyjną pobierano ich fragmenty i umieszczano na pożywce bakteriologicznej. Z 56 eksplantatów na etapie stabilizacji, po wyłożeniu wycinków na pożywkę bakteryjnej, uzyskano 10 izolatów bakterii z odmiany Jarus oraz 18 z odmiany Ornak (Tab. 5 i 6) (Tab. 7C). Izolaty bakteryjne były poddane testom na wrażliwość na działanie poszczególnych antybiotyków.

Tabela 7. Charakterystyka bakterii uzyskanych ze stabilizujących się kultur jagody kamczackiej (A), maliny (B) i czosnku (C)

A

odmiana jagody kamczackiej		‘Wojtek’	‘Zojka’
liczba testowanych eksplantatów		4	74
liczba uzyskanych izolatów		1	6
barwienie Grama 3% KOH	Gram +		6
	Gram -	1	
kształt kom. bakteryjnych	sferyczne		1
	cyldryczne	1	5
kolor kolonii na poź. NA	żółte		1
	białe		1
	białe przejrzyste	1	
	kremowe		4
typowany rodzaj	<i>Paenibacillus</i>	1	
	<i>Bacillus</i>		4

B

odmiana maliny		‘Polana’	‘Polka’
liczba testowanych eksplantatów		9	0
liczba uzyskanych izolatów		4	0
barwienie Grama 3% KOH	Gram +	2	
	Gram -	2	
kształt kom. bakteryjnych	sferyczne	1	
	cyldryczne	3	
kolor kolonii na poź. NA	żółte	1	
	kremowe przejrzyste	3	

C

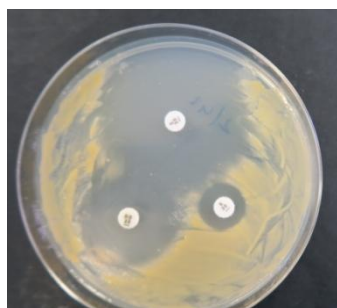
odmiana czosnku		‘Ornak’	‘Jarus’
liczba testowanych eksplantatów		15	41
liczba uzyskanych izolatów		18	10
barwienie Grama 3% KOH	Gram +	10	6
	Gram -	8	4
kolor kolonii na poź. NA	brudnożółta		1
	j.żółta	3	3
	żółta	6	2
	biała	2	1
	kremowa	3	2
	pomarańczowa	4	1
typowany rodzaj	<i>Actinomycetes</i>		1

Izolaty bakterii uzyskane ze stabilizujących się kultur czosnku, jagody kamczackiej i maliny częściowo scharakteryzowano i poddano ocenie odporności/wrażliwości na antybiotyki.

Antybiogramy wykonano na pożywce Mueller-Hinton z wykorzystaniem krążków antybiotykowych firmy Oxoid (Zdj.11), zawierających substancję biologicznie czynną w stężeniu: Ampicylina - 25 μ g (AMP 25); Cefotaksym - 30 μ g (CTX 30); Chloramfenikol - 30 μ g (C 30); Doksycyklina - 30 μ g (DO 30); Erytromycyna - 30 μ g (E 30); Flukonazol - 25 μ g (FLU 25); Gentamycyna - 30 μ g (CN 30); Kanamycyna - 30 μ g (K 30); Karbenicylina - 100 μ g (CAR 100); Neomycyna - 30 μ g (N 30); Nystatyna - 100 μ g (NS 100); Ryfampicyna - 30 μ g (RD 30); Streptomycyna - 10 μ g (S 10); Tetracyklina - 30 μ g (TE 30); .Wankomycyna - 30 μ g (VA 30)

Tabela 8. Liczba uzyskanych pąków/pędów ocenionych wstępnie jako wolne od bakterii, testowanych na pożywkach mikrobiologicznych, liczba uzyskanych izolatów, liczba bakterii poddanych testowaniu na odporność na antybiotyki

Badana roślina	Liczba uzyskanych eksplantatów	Liczba testowanych eksplantatów	Liczba zanieczyszczonych eksplantatów	Liczba testowanych izolatów bakteryjnych	Liczba eksplantatów ocenionych wstępnie jako wolne od bakterii
czosnek	56	56	19	28	37
Jagoda kamczacka	78	78	7	7	65
malina	9	9	4	4	5



Zdjęcie 11. Przykład antybiogramu

Zdjęcie: K. Nowak

Wrażliwość szczepu na dany antybiotyk przedstawiono w Tabeli 9.

Zgodnie z aktualną wiedzą, kultury roślinne nie są wolne od bakterii endogennych. Bakterie tworzą z rośliną wspólny organizm, pełniąc różne role. Z powodu braku dostatecznej wiedzy na ten temat, określa się je ogólnie jako współżyjące, neutralne lub pożyteczne. Ich wpływu na fenotyp roślin zazwyczaj nie można wydzielić. Dotyczy to roślin rosnących w warunkach naturalnych. W kulturach roślinnych *in vitro*, naturalne współżycie bakterii z roślinami ulega zakłóceniu w wyniku usunięcia bakterii powierzchniowych i części wewnętrznych a także w wyniku zmiany warunków środowiska roślin a także obecnych w nich bakterii. Część pozostałych w tkankach bakterii rozmnaża się i ujawnia na pożywce roślinnej bardzo szybko (i te kultury należy usuwać), inne można wyizolować wykładając fragmenty eksplantatów na pożywki mikrobiologiczne a inne ujawniają się na różnych etapach kultury, najczęściej w wyniku zaistnienia warunków stresowych i w wyniku pojawiania się nekroz na eksplantatach roślinnych.

Tabela 9. Ocena wrażliwości bakterii pochodzących ze stabilizowanych kultur jagody kamczackiej, czosnku i maliny na antybiotyki

Źródło izolatu	Liczba testowa - nych izolatów	Liczba izolatów wrażliwych na antybiotyki												
		AMP 25	CTX 30	C 30	DO 30	E 30	CN 30	K 30	CAR 100	N 30	RD 30	S 10	TE 30	VA 30
czosnek	28	18	1	15	21	15	21	23	0	nb	2	0	18	19
malina	4	3	3	0	4*	3	4*	3	3	3	4*	3	3	0
jagoda kamczacka	7	6	4	6	6	5	7	6	7	7	7	6	6	7

7. Ocena wzrostu i rozwoju roślin jagody kamczackiej oraz kondycji fizjologicznej podczas stabilizacji kultur *in vitro*

W celu optymalizacji składu pożywki dla jagody kamczackiej w fazie inicjalnej i stabilizacji kultur prowadzono następujące badania:

a/ wpływ różnych stężeń sacharozy (5, 10, 15, 20 g/l), soli azotu (KNO_3 , NH_4NO_3 - 25%, 50%, 100% wg MS) na wzrost i aktywację pąków bocznych;

b/ wpływ cytokinin (2iP, m-Topolina) podawanych oddzielnie lub łącznie na wielkość współczynnika namnażania i jakość pędów;



Zdjęcie 12. Wpływ stężenia sacharozy (5, 10, 15, 20 g/l) i soli azotu (KNO_3 , NH_4NO_3 - 25%, 50%, 100% wg MS) na wzrost pędów kątowych jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' rozwijających się z eksplantatów węzłowych pochodzących z kultur *in vitro*

Zdjęcia: E. Gabryszewska



Zdjęcie 13. Ustabilizowane kultury pędów bocznych jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' na zmodyfikowanej pożywce MS zawierającej 2iP 15 mg l⁻¹ + m-Topolinę 1 mg l⁻¹

Zdjęcie: E. Gabryszewska

Najlepszy wzrost, współczynnik namnażania i jakość pędów uzyskano na pożywce zestawionej agarom 1 g l⁻¹ + gelrite 1,2 g l⁻¹, zawierającej sacharozę w stężeniu 20 g l⁻¹, sole azotu o 100% zawartości (KNO_3 i NH_4NO_3) oraz 2iP 15 mg l⁻¹ + m-Topolina 1 mg l⁻¹ (Zdj. 12 i 13).

8. Ocena tożsamości genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku przed zainicjowaniem kultur *in vitro*

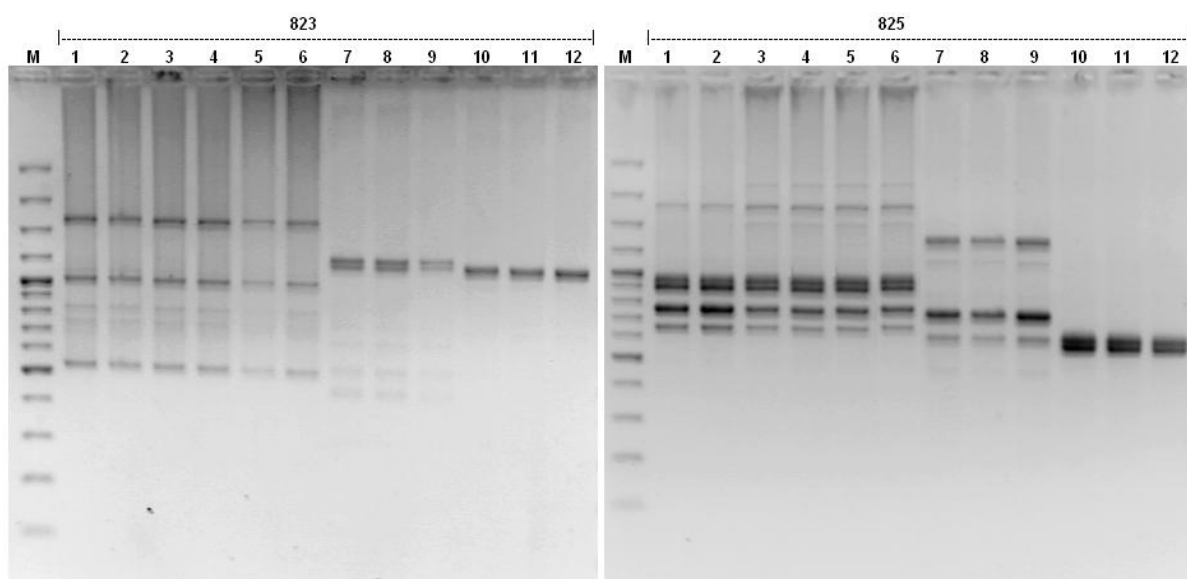
Wykonanie oceny tożsamości genetycznej roślin matecznych przebiegało w następujących etapach:

- 1/ Pobranie materiału roślinnego
- 2/ Izolacja DNA
- 3/ Analiza ISSR
- 4/ Analiza AFLP

Wyizolowano DNA z roślin matecznych truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku. Przeprowadzono wszystkie reakcje PCR mające na celu analizę markerów ISSR oraz AFLP. Dokonano analizy markerów ISSR oraz AFLP dla 4 gatunków: truskawki, maliny, jagody kamczackiej oraz czosnku z wykorzystaniem 15 starterów ISSR oraz 15 par starterów AFLP. Wykonane analizy wykorzystane zostały do oceny tożsamości genetycznej roślin matecznych badanych gatunków.

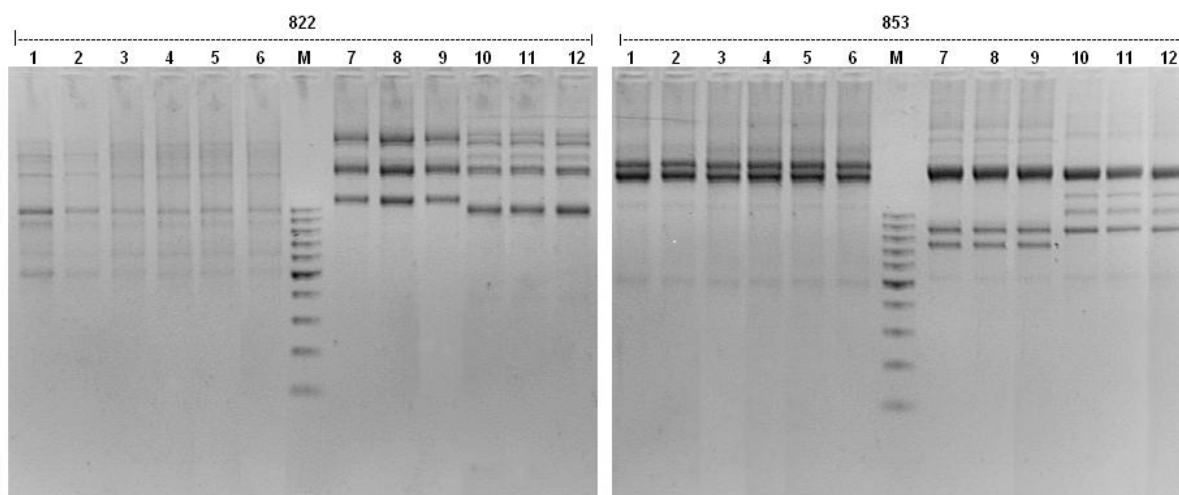
Analiza ISSR

Z testowanych starterów ISSR wybrano te, które pozwalają na różnicowanie badanych odmian w największym stopniu: starter 825 dla jagody kamczackiej i startery 822, 825, 840, 853 oraz 855 dla czosnku (Zdj. 14-15).



Zdjęcie 14. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych jagody kamczackiej ('Wojtek' –1, 2 i 'Zojka' –3, 4, 5, 6) oraz czosnku ('Ornak' –7, 8, 9 oraz 'Jarus' –10, 11, 12) wykonanych techniką ISSR-PCR przy zastosowaniu startera 823 oraz 825. Wzorzec masowy (M) – 100 bp DNA LadderPlus (Fermentas)

Zdjęcie: M. Markiewicz



Zdjęcie 15. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych jagody kamczackiej ('Wojtek' -1, 2 i 'Zojka' -3, 4, 5, 6) oraz czosnku ('Ornak' -7, 8, 9 oraz 'Jarus' - 10, 11, 12) wykonanych techniką ISSR-PCR przy zastosowaniu startera 822 oraz 853. Wzorzec masowy (M) – 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

Zdjęcie: M. Markiewicz

Analiza AFLP

Analizę polimorfizmu DNA pomiędzy odmianami badanych 4 gatunków: truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku przedstawia Tabela 10. Przedstawiono przykładowe zdjęcia rozdziału elektroforetycznego markerów AFLP w żelu poliakrylamidowym (Zdj. 16 i 17).

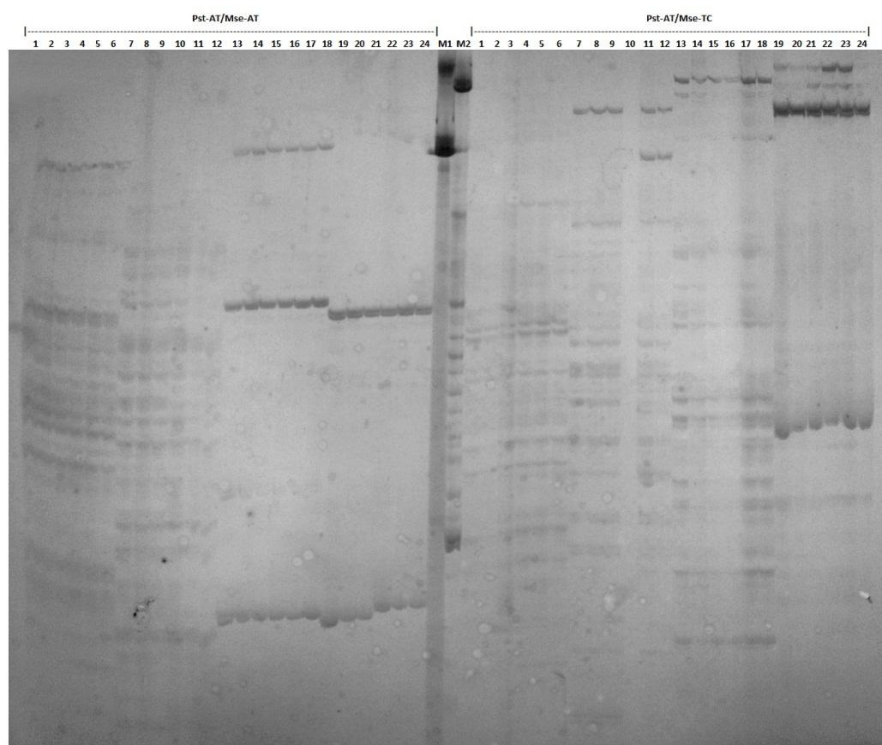
Przeprowadzone do tej pory analizy AFLP roślin matecznych badanych odmian wszystkich 4 gatunków pozwoliły na jednoznaczne określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy roślinami matecznymi – wszystkie badane rośliny mateczne w obrębie badanych odmian są tożsame genetycznie.

Z przetestowanych par starterów AFLP wybrane zostały te, które pozwalają na różnicowanie badanych odmian w największym stopniu. Dla truskawki 3 pary starterów (Pst-TC/Mse-AT; Pst-GA/Mse-GA; Pst-CC/Mse-GG), dla maliny 5 par (Pst-AT/Mse-AT; Pst-AT/Mse-TC; Pst-AC/Mse-AC; Pst-CC/Mse-CC; Pst-CC/Mse-GG), dla czosnku 5 par (Pst-TC/Mse-TC; Pst-AA/Mse-AC; Pst-CC/Mse-CC; Pst-CC/Mse-GG; Pst-TT/Mse-CC), a dla jagody kamczackiej 1 para starterów (Pst-CC/Mse-CC).

Tabela 10. Analiza markerów AFLP w roślinach matecznych badanych gatunków

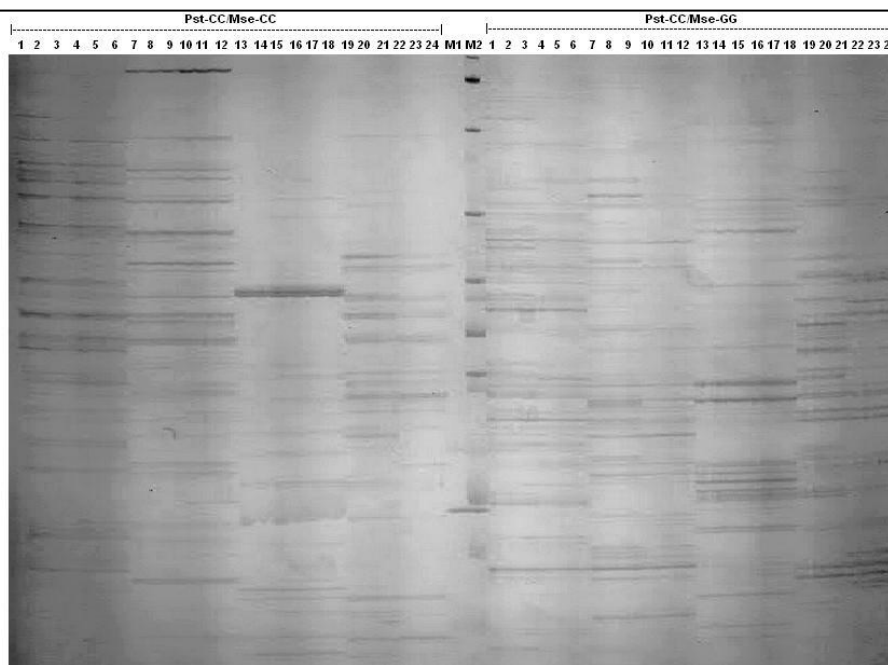
Gatunek	Numer startera ISSR	Wielkość produktów amplifikacji [pz]	Liczba produktów amplifikacji		Polimorfizm [%]
			ogółem	polimorficzne	
truskawka	Pst-TC/Mse-TC	600 – 350	8	0	0
	Pst-TC/Mse-AT	500 – 300	20	2	10,0
	Pst-AT/Mse-AT	330 – 80	12	0	0
	Pst-AT/Mse-TC	300 – 70	12	0	0
	Pst-AA/Mse-AA	330 – 100	17	0	0
	Pst-AA/Mse-AC	350 – 70	28	0	0
	Pst-AC/Mse-AC	250 – 80	17	0	0
	Pst-AC/Mse-AA	320 – 130	13	0	0
	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-	-
	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-	-
	Pst-GA/Mse-GA	350 – 90	43	5	11,6

	Pst-GA/Mse-GC	320 – 100	5	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	400 – 70	38	0	0
	Pst-CC/Mse-GG	400 – 70	47	5	10,6
	Pst-TT/Mse-CC	-	-	-	-
malina	Pst-TC/Mse-TC	500 – 350	7	0	0
	Pst-TC/Mse-AT	500 – 330	9	0	0
	Pst-AT/Mse-AT	300 – 50	20	2	10,0
	Pst-AT/Mse-TC	350 – 50	25	2	8,0
	Pst-AA/Mse-AA	330 – 100	29	0	0
	Pst-AA/Mse-AC	350 – 60	48	3	6,25
	Pst-AC/Mse-AC	310 – 80	28	3	10,7
	Pst-AC/Mse-AA	330 – 100	19	0	0
	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-	-
	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-	-
	Pst-GA/Mse-GA	330 – 120	40	0	0
	Pst-GA/Mse-GC	250 – 100	6	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	450 – 90	46	10	21,7
	Pst-CC/Mse-GG	400 – 80	47	8	17,0
	Pst-TT/Mse-CC	-	-	-	-
jagoda kamczacka	Pst-TC/Mse-TC	350 – 180	13	0	0
	Pst-TC/Mse-AT	400 – 330	2	0	0
	Pst-AT/Mse-AT	330 – 100	5	0	0
	Pst-AT/Mse-TC	350 – 50	25	0	0
	Pst-AA/Mse-AA	250 – 80	13	0	0
	Pst-AA/Mse-AC	300 – 50	37	0	0
	Pst-AC/Mse-AC	200 – 80	12	0	0
	Pst-AC/Mse-AA	280 – 130	8	0	0
	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-	-
	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-	-
	Pst-GA/Mse-GA	350 – 100	19	0	0
	Pst-GA/Mse-GC	330 – 150	9	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	300 – 80	20	6	30,0
	Pst-CC/Mse-GG	360 – 60	43	0	0
	Pst-TT/Mse-CC	450 – 50	48	0	0
czosnek	Pst-TC/Mse-TC	450 – 70	19	7	36,8
	Pst-TC/Mse-AT	400 – 330	2	0	0
	Pst-AT/Mse-AT	300 – 100	4	2	50,0
	Pst-AT/Mse-TC	400 – 250	8	0	0
	Pst-AA/Mse-AA	600 – 80	17	0	0
	Pst-AA/Mse-AC	330 – 50	30	13	43,3
	Pst-AC/Mse-AC	180 – 80	9	3	33,3
	Pst-AC/Mse-AA	600 – 70	14	3	21,4
	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-	-
	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-	-
	Pst-GA/Mse-GA	450 – 350	8	1	12,5
	Pst-GA/Mse-GC	250 – 120	8	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	370 – 70	32	3	9,4
	Pst-CC/Mse-GG	370 – 80	50	16	32,0
	Pst-TT/Mse-CC	420 – 50	63	13	20,6



Zdjęcie 16. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych truskawki ('Grandarosa' – 1, 2, 3 oraz 'Selva' – 4, 5, 6), maliny ('Polana' – 7, 8, 9 oraz 'Polka' – 10, 11, 12), jagody kaczackiej ('Wojtek' – 13, 14 i 'Zojka' – 15, 16, 17, 18) oraz czosnku ('Ornak' – 19, 20, 21 oraz 'Jarus' – 22, 23, 24) wykonanych techniką AFLP-PCR przy zastosowaniu par starterów Pst-AT/Mse-AT oraz Pst-AT/Mse-TC. Wzorce masowe: M1 - 10 bp DNA Ladder (Invitrogen), M2 – 50 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Zdjęcie: M. Markiewicz



Zdjęcie 17. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych truskawki ('Grandarosa' – 1, 2, 3 oraz 'Selva' – 4, 5, 6), maliny ('Polana' – 7, 8, 9 oraz 'Polka' – 10, 11, 12), jagody kaczackiej ('Wojtek' – 13, 14 i 'Zojka' – 15, 16, 17, 18) oraz czosnku ('Ornak' – 19, 20, 21 oraz 'Jarus' – 22, 23, 24) wykonanych techniką AFLP-PCR przy zastosowaniu par starterów Pst-CC/Mse-CC oraz Pst-CC/Mse-GG. Wzorcemasowe: M1 - 10 bp DNA Ladder (Invitrogen), M2 – 50bp DNA Ladder (Invitrogen).

9. Podsumowanie i wnioski

1/ Określono warunki i metody wykrywania wirusów w roślinach matecznych dla poszczególnych gatunków roślin: maliny, truskawki, jagody kamczackiej, czosnku

2/ Opracowano metody efektywnej inicjacji i stabilizacji kultur *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku

3/ Opracowano metody wykrywania zanieczyszczeń bakteryjnych na etapie inicjowania kultur *in vitro* i podczas ich stabilizacji - otrzymano izolaty bakteryjne dla następujących gatunków roślin: malina 4 izolaty bakteryjne, truskawka (izolaty bakteryjne otrzymano z 23 eksplantatów), jagody kamczackiej 7 izolatów bakteryjnych i czosnku 28 izolatów bakteryjnych.

4/ Oceniono tożsamość genetyczną roślin matecznych truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku przed zainicjowaniem kultur *in vitro*. Analizy ISSR i AFLP wykonane z wykorzystaniem 15 starterów ISSR oraz 15 par starterów AFLP, pozwoliły na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy roślinami matecznymi – wszystkie badane rośliny mateczne w obrębie badanych odmian są tożsame genetycznie. Analiza markerów ISSR dla 2 gatunków: jagody kamczackiej i czosnku; Analiza markerów AFLP dla 4 gatunków: truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku

10. Literatura

Boxus, P., 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. J. Hort. Sci. 49, 209-210.

Dziedzic E., 2008. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Pojark.) in *in vitro* culture. J. Fruit Orn. Plant Res. 16, 93–100.

Dziedzic E., 2009. Effect of culture form, sucrose and iron on blue honeysuckle shoot proliferation. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol. 536, 73-80.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 148-151.

Knop W., 1865. Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch. Vers. Stn. 7: 93-107.

Kraciński P. 2014. Zbiory i rozdysponowanie produkcji truskawek, malin i porzeczek w Polsce w latach 2001-2012. Roczniki Naukowe Ekonomii Rolnictwa i Rozwoju Obszarów Wiejskich, 101 (2): 132-140.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

<http://www.fresh-market.pl>

11. Zespół badawczy

Kierownik zadania: dr hab. E. Gabryszewska, prof. IO

Zastępca kierownika: dr A. Wojtania

Wykonawcy: prof. dr hab. K. Górecka, prof. dr hab. T. Orlikowska, dr hab. M. Cieślińska, prof. IO, dr hab. M. Podwyszyńska, prof. IO, dr J. Góraj-Koniarska, dr W. Kiszczak, dr T. Malinowski, dr I. Sowik, mgr A. Kapuścińska, mgr U. Kowalska, mgr M. Markiewicz, mgr K. Nowak, mgr A. Trzewik, inż. A. Rojek, inż. L. Tułacz, J. Białek, G. Korpas, H. Karolak, L. Ogórek, D. Prochaska, D. Starzec, G. Szczehowicz, J. Trojańczyk, E. Wojciechowska