



Zakład Biologii Ogólnej
Pracownia Fizjologii i Morfogenezy
Pracownia Biochemii
Zakład Ochrony Roślin Sadowniczych
Pracownia Fitopatologii Sadowniczej
Samodzielna Pracownia Mikroskopii

**Metodyka inicjacji i stabilizacji kultur oraz namnażania
pędów jagody kamczackiej
(*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) *in vitro***

część I

Opracowanie pod redakcją: dr hab. Eleonora Gabryszewska, prof. IO, dr Justyna Góraj-Koniarska

Autorzy opracowania:

Dr hab. E. Gabryszewska, prof. dr hab. T. Orlikowska prof. IO, dr J. Góraj-Koniarska, dr T. Malinowski, mgr M. Markiewicz, dr A. Wojtania

Autorzy zdjęć:

E. Gabryszewska, J. Góraj-Koniarska, K. Nowak

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 2016

Spis treści:

1. Wstęp

- 1.1 Jagoda kamczacka - nowa roślina jagodowa w polskim ogrodnictwie
- 1.2 Rozmnażanie roślin ogrodnich metodą *in vitro*

2. Cel

3. Etap izolacji eksplantatów inicjalnych i stabilizacja kultury

- 3.1 Ocena zdrowotności pod względem obecności patogenicznych wirusów materiału roślinnego przed zainicjowaniem kultur *in vitro*
- 3.2 Ocena tożsamości genetycznej odmian jagody kamczackiej przed zainicjowaniem kultur *in vitro*
- 3.3 Izolacja eksplantatów inicjalnych
- 3.4 Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie inicjowania i podczas stabilizacji
- 3.5 Cena wzrostu i rozwoju oraz kondycji fizjologicznej podczas stabilizacji kultur *in vitro*

4. Etap namnażania kultur pędów

- 4.1 Ocena zdrowotności kultur pędów w fazie namnażania pod względem obecności patogenicznych wirusów
- 4.2 Etap namnażanie pędów
- 4.3 Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych podczas fazy namnażania kultur pędów
- 4.4 Analiza markerów ISSR oraz AFLP dla badanych odmian jagody kamczackiej w czasie optymalizacji warunków prowadzenia kultur *in vitro*.

5. Korzyści wynikające z zastosowania systemu oceny zdrowotności i jakości materiału nasadzeniowego rozmnażanego *in vitro* w produkcji ogrodniczej

6. Zespół badawczy

7. Literatura

1. Wstęp

1.1 Jagoda kamczacka - nowa roślina jagodowa w polskim ogrodnictwie

W ostatnich latach obserwuje się wśród producentów owoców i amatorów ogrodników duże zainteresowanie nowymi gatunkami roślin sadowniczych. Do takich należy jagoda kamczacka, czyli suchodrzew kamczacki, znana również pod nazwą wiciokrzew kamczacki. Jest to odmiana suchodrzewu sinego - *Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast., gatunku należącego do rodziny *Caprifoliaceae* (Przewiertniowate). W polskim ogrodnictwie najbardziej znana jest jednak jako jagoda kamczacka. Roślina ta pochodzi z krajów Dalekiego Wschodu – Rosji (Kamczatka), Chin, Japonii. W obrębie rodzaju występuje ok. 200 gatunków (Svarcova i in. 2007). To najwcześniej owocująca roślina jagodowa - owoce dojrzewają na przełomie maja i czerwca. Krzewy są bardzo wytrzymałe na mróz i znoszą temperaturę do -45°C , a kwiaty nawet do -8°C . Jest to roślina długowieczna i może owocować nawet 30 lat. Jagoda kamczacka należy do roślin mających duże możliwości w uprawie ekologicznej i integrowanej, ponieważ gatunek ten jest odporny na choroby i rzadko zasiedlany przez szkodniki (Buczek, 2016). Owoce jagody kamczackiej to pseudojagody o butelkowatym kształcie i fioletowo granatowej barwie, pokryte ciemnoniebieskim woskowym nalotem, nadają do zbioru mechanicznego. Ich zaletą są bardzo duże wartości odżywcze, gdyż zawierają wiele cennych związków organicznych i mineralnych, przez co charakteryzują się działaniem wzmacniającym, przeciwzapalnym i bakteriostatycznym (Svarcova i in. 2007). Nadają się one do bezpośredniego spożycia a także dla przetwórstwa. Wprowadzenie nowego gatunku - jagody kamczackiej, zwiększy asortyment uprawianych roślin sadowniczych. Zastosowanie rozmnażania metodą *in vitro* znacząco przyspieszy introdukcję nowych odmian tego gatunku na rynku krajowym. Dla plantatorów roślin jagodowych zwiększone będą możliwości poszerzenia arealu upraw i uzyskania dodatkowych dochodów. Zainteresowani nowym gatunkiem są również ogrodnicy amatorzy, uprawiający rośliny sadownicze na własne potrzeby.

1.2 Rozmnażanie roślin ogrodniczych metodą *in vitro*

Rozmnażanie roślin metodą *in vitro* jest ważną technologią rozmnażania, powszechnie stosowaną w produkcji ogrodniczej. Metoda ta wykorzystywana jest w produkcji elitarnego materiału szkółkarskiego roślin sadowniczych, w masowej produkcji sadzonek wielu gatunków roślin ogrodniczych, głównie ozdobnych, a także w pracach hodowlanych. Technika ta umożliwia otrzymanie dużej liczby jednorodnego materiału o wysokiej jakości niezależnie od pory roku oraz w większym stopniu niż inne metody rozmnażania

wegetatywnego, pozwala na otrzymanie roślin wolnych od patogenów wirusowych, bakteryjnych i grzybowych. Przyspiesza ona również prace hodowlane i pozwala na szybkie wprowadzenie na rynek nowych odmian. Metoda *in vitro* stosowana jest w produkcji elitarnego (przedbazowego) sadowniczego materiału szkółkarskiego (podkładek wegetatywnych, sadzonek truskawki, maliny, borówki amerykańskiej, itp.), który z kolei służy do zakładania mateczników i produkcji kwalifikowanego materiału szkółkarskiego wolnego od wirusów i fitoplazm. W Polsce roczna produkcja kwalifikowanych drzewek roślin sadowniczych w latach 2002-2011 wahała się od 7 do 11 mln, natomiast produkcja materiału szkółkarskiego CAC (spełniającego minimalne wymagania) szybko wzrasta i w 2010 r. wynosiła już 15,2 mln sztuk (Czynczyk, 2012). W przypadku roślin jagodowych zbyt wiele plantacji zakłada się z niekwalifikowanych sadzonek, co wpływa na obniżenie plonów. W związku z tym, konieczna jest poprawa jakości materiału szkółkarskiego, poprzez opracowanie i wdrożenie do produkcji ogrodniczej procedur oceny jakości materiału nasadzeniowego.

W kulturach *in vitro* wymagana jest kontrola obecności nie tylko mikroorganizmów chorobotwórczych, lecz także niepatogenicznych gatunków saprofitycznych (bakterii i grzybów), które w specyficznych warunkach kultur tkankowych mogą zachowywać się jak „vitropatogeny” i niszczyć tkanki rośliny i/lub obniżać współczynnik namnażania. Poza zdrowotnością materiału istotnym zagadnieniem jest tożsamość genetyczna rozmnażanych metodą *in vitro* gatunków i odmian roślin ogrodnich. Zmiany powstałe podczas prowadzenia kultury zwane zmiennością somaklonalną mogą być wynikiem mutacji i są trwałe (zmienność genetyczna) lub częściej, przejściowe (zmienność epigenetyczna). Zmiany epigenetyczne mogą dotyczyć cech morfologicznych, takich jak kształt i struktura powierzchni liści, obecność kolców czy pokładanie się pędów lub funkcjonalnych, takich jak zwiększona zdolność do tworzenia pędów, opóźnienie okresu tworzenia organów generatywnych, drobnienie owoców. . Występowanie zmienności somaklonalnej o charakterze genetycznym i epigenetycznym obserwowane, m.in. u truskawki i borówki amerykańskiej dotyczyło zaburzeń w wytwarzaniu i rozmieszczeniu chlorofilu, zmian kształtu liści, opóźnienia kwitnienia i owocowania oraz drobnienia owoców. Korzystnym zjawiskiem wynikającym ze zmienności epigenetycznej jest zatrzymanie rozwoju roślin na etapie młodocianym, które skutkuje, m.in., zwiększeniem zdolności do ukorzenia sadzonek zielnych i półdrewniałych. Ta cecha może być wykorzystana przez szkółkarzy do zakładania wydajnych mateczników z roślin mnożonych *in vitro*.

W literaturze jest kilka publikacji na temat rozmnażania jagody kamczackiej w kulturach *in vitro*. Podawane metody *in vitro* opracowywano z przeznaczeniem wykorzystania ich zarówno w produkcji mikrosadzonek (Karhu 1997a, b, 2003, Sedlák i Paprštejn 2007, Qu i in. 2008, Dziedzic 2008, 2009), jak i specjalnie dla prac hodowlanych (Gawroński in. 2013). Dotychczas nie opracowano jednak systemu łączącego metodę rozmnażania *in vitro* z zabiegami mającymi na celu uzyskanie zdrowego i wysokiej jakości materiału rozmnożeniowego tego gatunku.

Opracowana metodyka powstała w oparciu o badania prowadzone w latach 2015-2016 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”

2. Cel

Celem badań jest opracowanie systemu oceny zdrowotności, tożsamości genetycznej i kondycji fizjologicznej jagody kamczackiej na etapach inicjacji i stabilizacji kultur oraz namnażania *in vitro*.

3. Izolacja eksplantatów inicjalnych i stabilizacja kultur

3.1 Ocena zdrowotności pod względem obecności patogenicznych wirusów materiału roślinnego przed zainicjowaniem kultur in vitro

W literaturze brakuje informacji na temat chorób jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.), w tym także tych powodowanych wirusami. W badaniach prowadzonych w Instytucie Ogrodnictwa do określenia statusu sanitarnego roślin matecznych jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' wykorzystano analizę profilu RNA metodą wysokowydajnego sekwencjonowania (NGS - *next generation sequencing*). Materiał roślinny pobierany do analiz to młode liście, tuż po rozwinięciu (Fot. 1).



Fot. 1. Młody pęd rozwijający się z pąka wierzchołkowego (po okresie spoczynku zimowego)

Nie stwierdzono obecności wirusów w roślinie matecznej odmiany 'Zojka'. Obecnie metoda ta jest zbyt droga do standardowego testowania roślin jagody kamczackiej na obecność wirusów.

3.2 Ocena tożsamości genetycznej odmian jagody kamczackiej przed zainicjowaniem kultur in vitro

W badaniach prowadzonych w Instytucie Ogrodnictwa opracowano metodę oceny tożsamości genetycznej roślin matecznych jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' i 'Wojtek'. 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 jagody kamczackiej. Przeprowadzono wszystkie reakcje PCR mające na celu analizę markerów ISSR oraz AFLP. Dokonano analizy markerów ISSR oraz AFLP dla 2 odmian jagody kamczackiej z wykorzystaniem 23 starterów ISSR oraz 23 par starterów AFLP. Wykonane analizy wykorzystane zostały do oceny tożsamości genetycznej roślin matecznych badanych odmian.

Analiza ISSR

Przeprowadzone w latach 2015-2016 analizy markerów ISSR pozwoliły na wytypowanie starterów w najwyższym stopniu różnicujących badane odmiany jagody kamczackiej ('Zojka' i 'Wojtek'). Z testowanych starterów ISSR (z listy UBC Primer Set) wybrano startery nr 825, 810, 827 oraz 865, które generowały polimorfizm prążkowy pomiędzy odmianami na poziomie – odpowiednio – 28,6; 16,7; 8,3 oraz 25%.

Analiza AFLP

Przeprowadzone w latach 2015-2016 analizy markerów AFLP roślin matecznych jagody kamczackiej pozwoliły na wytypowanie par starterów AFLP różnicujących badane odmiany. Z przetestowanych par starterów AFLP dla jagody kamczackiej wybrane zostały 4 pary: Pst-CC/Mse-CC, Pst-TT/Mse-CC, Pst-GC/Mse-TA, Pst-CG/Mse-AG (wg Vos i wsp. 1995), które pozwalają na różnicowanie badanych odmian w największym stopniu. Polimorfizm prążkowy generowany przez wytypowane pary starterów wynosił odpowiednio 30; 13,3; 11,1 oraz 4,8%.

3.3 Izolacja eksplantatów inicjalnych i stabilizacja kultur pędów

Eksplantaty inicjalne: pąki wierzchołkowe i fragmenty pędów zawierające pąki kątowe

Termin izolacji: eksplantaty wyjściowe pobierano wiosną (luty, marzec) z roślin uprawianych w chłodnej szklarni

Odkazanie eksplantatów inicjalnych: metoda podwójnego odkazania eksplantatów

I - odkażanie wstępne: roztwór wodny Ace 5-7 ml /100 ml sterylnej wody destylowanej przez okres 20 min. (wyrzaskarka - 90 obr./min), suszenie eksplantatów

II - wyizolowane pąki poddaje się powtórnemu odkażaniu w 0,1% roztworze HgCl₂ (kilka sekund); po dokładnym wysuszeniu pąków wyklada się je na pożywkę.

Skład pożywki na etapie inicjalnego wzrostu eksplantatów i stabilizacji kultur:

Zmodyfikowana pożywka Murashige i Skooga (1962) przez dodatek 85 mg/l NaH₂PO₄·H₂O, oraz inozytol 100 mg l⁻¹, glicyna 2 mg l⁻¹, witaminy B₁, B₆, PP po 1 mg l⁻¹, sacharoza 20-30 g l⁻¹, 2iP 15 mg l⁻¹ + mT (mTopolina) 1 mg l⁻¹, agar 2 g l⁻¹ + gelrite 1,2 g l⁻¹, pH pożywki - 5,6

Warunki fizyczne podczas wzrostu kultur *in vitro*

Materiał roślinny rósł w temperaturze 23°C, przy świetle o długości dnia 16 h. Jako źródło światła stosowano lampy fluorescencyjne Philips TLD 36W/95 – białe (80 μmol m⁻²s⁻¹).



A

B

Fot. 2. Początkowy rozwój pędu z izolowanego pąka wierzchołkowego jagody kamczackiej odmiany 'Zojka'(A); pędy jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' uzyskane *in vitro* z 2-węzłowych fragmentów pędu (faza stabilizacji kultury) na pożywce MS zawierającej 2iP 15 mg l⁻¹ + m-Topolinę 1 mg l⁻¹ (B)

W badaniach prowadzonych w ramach Programu Wieloletniego podejmowało wzrost od 40,7% do 77,7% eksplantatów inicjalnych, natomiast liczba zmarłych eksplantatów wynosiła od 13,4% do 49, 2%. Liczba regenerujących eksplantatów zależała od genotypu, rodzaju izolowanego eksplantatu i sposobu ich odkażania. W fazie inicjalnego wzrostu eksplantatów (Fot. 2A), jak i podczas stabilizacji kultur pędów (Fot. 2B) jagody kamczackiej stosowano pożywkę o takim samym składzie. Intensywny wzrost pąków wierzchołkowych i bocznych oraz namnażanie pędów kątowych uzyskano na pożywce MS (1962) zawierającej sacharozę w stężeniu 20 -30 g l⁻¹, 2iP 15 mg l⁻¹ + mT 1 mg l⁻¹ zestawionej agarem 2 g l⁻¹ + gelrite 1,2 g l⁻¹ (Fot. 2 A, B).

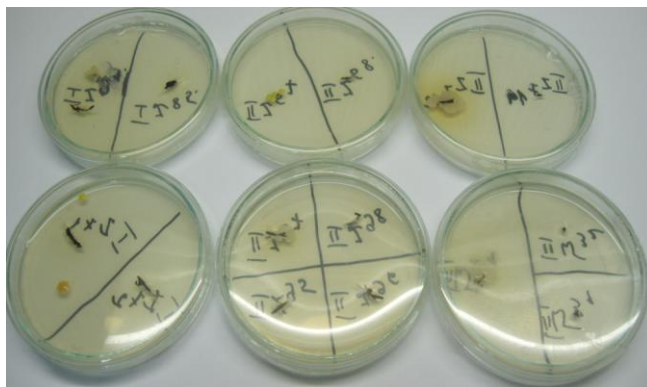
3.4 Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie inicjowania kultur pędów i podczas ich stabilizacji

Po 3 dniach od izolacji eksplantatów inicjalnych rozpoczęto usuwanie kultur zanieczyszczonych grzybami lub bakteriami, których wzrost był widoczny na pożywce. Liczba zanieczyszczonych eksplantatów zależała od genotypu, rodzaju izolowanego eksplantatu i metody ich odkażania i wahała się od 8,9% do 10,2 % wszystkich pobranych i wyizolowanych eksplantatów inicjalnych. 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 wykryć, wykładając fragmenty eksplantatów na pożywki mikrobiologiczne. Zanieczyszczenia ujawniają się na różnych etapach kultury, także po upływie wielu pasaży, najczęściej w wyniku zaistnienia warunków stresowych i pojawiania się nekroz na eksplantatach roślinnych. Rola tych bakterii w życiu roślin, w tym ich wpływ na eksplantaty w kulturach *in vitro* nie zostały poznane, choć wiadomo, że w pewnych warunkach mogą być szkodliwe, dlatego należy ograniczać ich występowanie przez cykliczne włączanie do pożywki bakteriocydów.

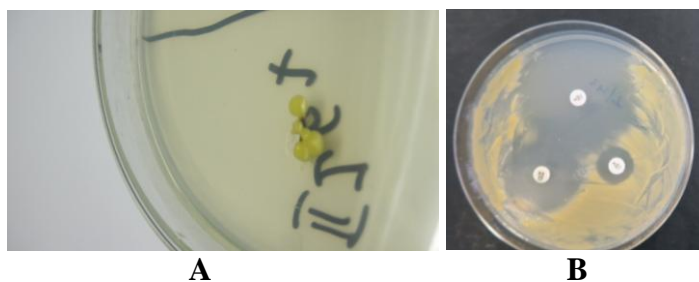
W ramach Programu Wieloletniego opracowano metodę testowania kultur jagody kamczackiej na obecność bakterii endogennych oraz oceniono wrażliwość izolatów na antybiotyki. Fragmenty dolnych części pędów wykładano na pożywkę mikrobiologiczną Nutrient Agar (NA). W ciągu 2 tygodni inkubacji w 25°C obserwowano 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. Z izolowanych 78 fragmentów pędów jagody kamczackiej, pozyskano jeden izolat bakterii z odmiany ‘Wojtek’ oraz sześć z odmiany ‘Zojka’. Zaklasyfikowano je do rodzaju *Paenibacillus* i *Bacillus*. Te bakterie należało z kultur wyeliminować lub ograniczać ich występowanie cyklicznie, stosując subkultury na pożywkach z antybiotykami lub innymi biocydami. W tym celu izolaty bakterii uzyskane ze stabilizujących się kultur poddano ocenie odporności/wrażliwości na antybiotyki. Antybiogramy (Fig. 3B) wykonano na pożywce Mueller-Hinton z wykorzystaniem krążków antybiotykowych firmy Oxoid, zawierających substancję biologicznie czynną w stężeniu:

Ampicylina – 25 µg (AMP 25); Cefotaksym – 30 µg (CTX 30); Chloramfenikol – 30 µg (C 30); Doksycyklina – 30 µg (DO 30); Erytromycyna – 30 µg (E 30); Flukonazol - 25 µg (FLU 25); Gentamycyna – 30 µg (CN 30); Kanamycyna – 30 µg (K 30); Karbenicylina – 100 µg (CAR 100); Neomycyna – 30 µg (N 30); Nystatyna - 100 µg (NS 100); Ryfampicylina – 30 µg (RD 30); Streptomycyna – 10 µg (S 10); Tetracyklina – 30 µg (TE 30); Wankomycyna – 30 µg (VA 30). Następnie oceniono wrażliwości bakterii pochodzących z inicjalnych lub ustabilizowanych kultur jagody kamczackiej.

Wszystkie izolaty bakterii (7 izolatów), uzyskane w stadium stabilizacji kultur, wykazywały wrażliwość na następujące antybiotyki: Gentamycyna – 30 µg (CN 30); Karbenicylina – 100 µg (CAR 100); Neomycyna – 30 µg (N 30); Ryfampicylina – 30 µg (RD 30); Wankomycyna – 30 µg (VA 30).



Fot. 3. Testowanie na obecność endogennych bakterii izolowanych podstaw pędów jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' i 'Wojtek' rosnących *in vitro*



Fot. 4. Wzrost bakterii na pożywce wokół izolowanego fragmentu pędu jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' (A) i antybiogram (B)

4. Etap namnażania kultur pędów

4.1 Ocena zdrowotności kultur pędów w fazie namnażania pod względem obecności patogenicznych wirusów

Do określenia statusu sanitarnego roślin jagody kamczackiej odmiany 'Wojtek' w fazie namnażania zastosowano analizę profilu RNA metodą wysokowydajnego sekwencjonowania

(NGS - *next generation sequencing*). Materiał roślinny pobierany do analiz to młode liście rozwijające się na pędach rosnących *in vitro*. Nie stwierdzono obecności wirusów w pędach jagody kaczackiej odmiany 'Wojtek' mnożonych *in vitro*.

4.2 Namnażanie kultur pędów

Eksplantaty: 2 - węzłowe fragmenty pędów zawierające pąki kątowe

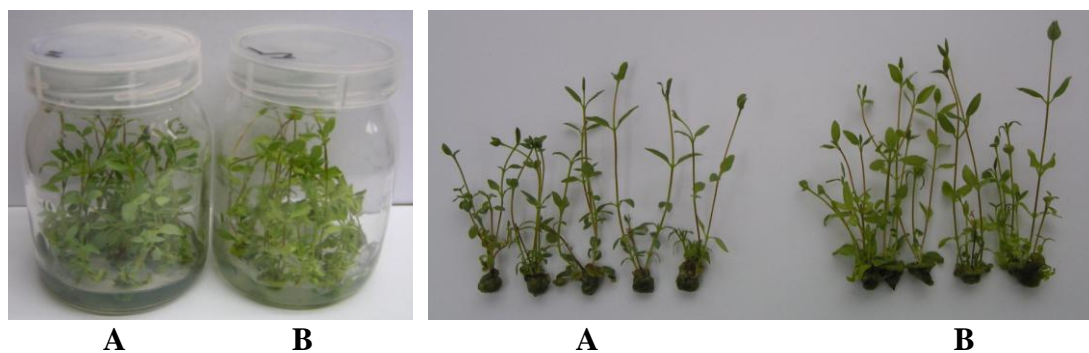
Długość pasażu: kultury pędów przenosi się na świeżą pożywkę co 6-8 tygodni

Skład pożywki na etapie namnażania:

Zmodyfikowana pożywka Murashige i Skooga (1962). Modyfikacja dotyczy soli azotowych KNO_3 i NH_4NO_3 , których stężenie powinno wynosić 50 lub 100% (w odniesieniu do pożywki MS), w zależności od stężenia sacharozy, które może wynosić od 30 do 50 g/l oraz $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, które dodaje się w ilości 85 mg l^{-1} . Proponowane stężenie komponentów organicznych: inozytol 100 mg l^{-1} glicyna 2 mg l^{-1} , witaminy B₁, B₆, PP po 1 mg l^{-1} , 2iP 15 mg l^{-1} + mT (mTopolina) 1 mg l^{-1} . Agar 2 g/l i gelrite 1,2 g/l, pH pożywki 5,6.

Warunki fizyczne podczas wzrostu kultur *in vitro*

Kultury umieszcza się w pomieszczeniu wzrostowym w temperaturze 23°C, przy świetle o długości dnia 16 h. Źródłem światła o natężeniu 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mogą być lampy fluorescencyjne Philips TLD 36W/95 – białe.



Fot. 5 Pędy jagody kaczackiej odmiany 'Zojka' (A) i 'Wojtek' (B) w fazie namnażania na pożywce MS zawierającej m-Topolinę + 2iP



Fot. 6 Kultury pędów jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' w fazie namnażania (w fitotronie)

Podczas fazy namnażania pędy dzielono na fragmenty 2-węzłowe i przenoszono na świeżą pożywkę co 6-8 tygodni. Z węzłów rozwijały się pędy, na których uaktywniały się pąki kątowe i wyrastały pędy boczne (Fot. 5A i B i 6). Maksymalną liczbę pędów bocznych (6,7 pędów/eksplantat) uzyskano na pożywkach zawierających 100% KNO_3 i 100% NH_4NO_3 oraz sacharozę w stężeniu $40\text{-}50 \text{ g l}^{-1}$.

4.3 Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych podczas namnażania kultur pędów

W fazie namnażania pędów jagody kamczackiej *in vitro* zastosowano taką samą metodę testowania kultur na obecność bakterii endogennych, jaką opracowano dla stadium inicjalnego i stabilizacji kultur. W tej fazie nie stwierdzono obecności bakterii endogennych.

4.4 Zastosowanie markerów ISSR oraz AFLP dla oceny tożsamości genetycznej odmian jagody kamczackiej w czasie optymalizacji warunków prowadzenia kultur *in vitro*

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas analiz zostały wytypowane zestawy markerów generowanych metodami ISSR-PCR oraz AFLP, przy pomocy których można zidentyfikować badane odmiany jagody kamczackiej (Tab. 1). Markery te zostaną wykorzystane w kolejnych etapach badań do analizy tożsamości genetycznej roślin na różnych etapach rozmnażania *in vitro* i rosnących *ex vitro*.

Tabela 1. Startery ISSR i AFLP wytypowane do generowania markerów określających tożsamość genetyczną jagody kamczackiej odmian 'Zojka' i 'Wojtek' na różnych etapach rozmnażania

<i>startery ISSR</i>	<i>startery AFLP</i>
825	Pst-CC/Mse-CC
810	Pst-TT/Mse-CC
827	Pst-GC/Mse-TA
865	Pst-CG/Mse-AG

5. Korzyści wynikające z zastosowania systemu oceny zdrowotności i jakości materiału nasadzeniowego rozmnażanego *in vitro* w produkcji ogrodniczej

Omawiana metoda rozmnażania *in vitro* jagody kamczackiej dotyczy dwóch pierwszych etapów: izolacji eksplantatów inicjalnych i stabilizacji kultur oraz etapu namnażania pędów *in vitro* (część I). Druga część czyli metodyka etapu ukorzenia pędów *in vitro* oraz aklimatyzacji mikrosadzonek w szklarni i dalszego wzrostu roślin w gruncie będzie przedmiotem dalszych badań.

Zastosowanie metody rozmnażania *in vitro* i kontrola jakości produkowanego materiału nasadzeniowego wnoszą liczne korzyści:

a/ Zwiększenie wydajności i poprawa jakości materiału szkółkarskiego, a co za tym idzie także zwiększenie plonów i lepsza jakość owoców. Zakładanie plantacji z niekwalifikowanego materiału nasadzeniowego, co jest jeszcze praktykowane, powoduje znaczne zagrożenie, skutkujące obniżeniem ilości i jakości plonu.

b/ Szybkie wprowadzanie i rozpowszechnianie w uprawie nowych odmian jagody kamczackiej czyli suchodrzewu jadalnego (suchodrzew siny).

c/ Kontrola tożsamości genetycznej umożliwia identyfikację odmian i eliminację ewentualnych mutacji na wszystkich etapach rozmnażania roślin *in vitro* i podczas wzrostu *ex vitro*.

d/ Opracowane procedury mogą być zastosowane w ośrodkach zajmujących się produkcją elitarnego materiału roślin ogrodniczych.

6. Zespół badawczy

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

Zastępca kierownika zadania: dr A. Wojtania

Wykonawcy: prof. dr hab. T. Orlikowska, dr J. Górąj-Koniarska, dr T. Malinowski, mgr M. Markiewicz, mgr K. Nowak, mgr A. Trzewik, inż. L. Tułacz, J. Białek, G. Szczechowicz, J. Trojańczyk

7. Literatura

Buczek M. 2015. Uprawa, odmiany i zbiór jagody kamczackiej. Szkolenie pt. „Uprawa, odmiany i zbiór jagody kamczackiej”, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, 7 września 2016 r. wykład. Szkolenie przygotowano w ramach zadań 1.3 i 1.7 realizowanego Programu Wieloletniego IHAR-PIB/IO oraz zadań 1.4., 3.4 i 5.1 Programu Wieloletniego IO.

Czynczyk A. 2012. Szkółkarstwo sadownicze, str. 163, PWRiL, ISBN 978-83-09-01086-9.

- Dziedzic E. 2008. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Pojark.) in *in vitro* culture. J. Fruit Ornament Plant Res. 16, 93–100.
- Dziedzic E. 2009. Effect of culture form, sucrose and iron on blue honeysuckle shoot proliferation. Zesz. Probl. Postępow. Nauk Rol. 536, 73–8.
- Gabryszewska E., Wojtania A. (red.) 2015. 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) - raport z realizacji zadania 1.5 prowadzonego w ramach Programu Wieloletniego: „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, 2015 r. str. 19
- Gawroński J., Żebrowska J., Kaczmarska E., Marecki W., Dyduch-Siemińska M., Hortyński J., Szypilo P., Szafrńska B., Czopska K. 2013. Analiza wzrostu i rozwoju siewek jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) w kulturze *in vitro*. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Lublin – Polonia, Vol. XXIII (4), 1-10.
- Karhu S.K. 1997a. Axillary shoot proliferation of blue honeysuckle. Plant Cell Tissue Organ Cult. 48, 195–201.
- Karhu S.K. 1997b. Rooting of blue honeysuckle microshoots. Plant Cell Tissue Organ Cult. 48, 153–159.
- Karhu S.K. 2003. Performance of *Lonicera* microcuttings as affected by mineral nutrients and genotype. Acta Hort. 616, 181–183.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Qu G., Huang L., Huo J., 2008. Regeneration of blue honeysuckle via dormant axillary buds. J. Northeast Agric. Univ. 15 (2), 9–1.
- Sedlák J., Paprštejn F. 2007. *In vitro* propagation of blue honeysuckle. Hortic. Sci. (Prague) 34(4), 129–131.
- Svarcova I., Heinrich J., Valentova K. 2007. Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea*. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 151 (2), 163–174.
- Wojtania A., Gabryszewska E. (red.) 2016. Ocena zdrowotności, wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych oraz ocena czystości odmianowej i tożsamości genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej i czosnku na etapie namnażania kultur *in vitro* (opracowanie zbiorowe) - raport z realizacji zadania 1.5 prowadzonego w ramach Programu Wieloletniego: „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, 2016 r. str. 71.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 11, 4407–4414.