

Praca wykonana w ramach Programu Wieloletniego (2015-2020), Zadanie 1.2 „Tworzenie i wdrażanie postępu biologicznego w systemie zrównoważonej produkcji sadowniczej (hodowla odpornościowa, jakościowa i adaptacyjna)”, finansowanego przez MRiRW.

## **Metodyka mikrorozmnażania podkładki jabłoni P 68**

Autorzy: mgr inż. Bogusława Napiórkowska, Krystyna Strączyńska  
Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

### Materiał roślinny

Eksplantaty pędów jabłoni w postaci pąków wierzchołkowych i kątowych, pobierane były z młodych jednorocznych roślin w okresie lipiec – sierpień.

### Sterylizacja materiału roślinnego

Steryлизację wstępną pąków przeprowadzano pod bieżącą wodą przez 90 minut, następnie w wodnym roztworze detergentu – 30 minut, który odpłukano pod bieżącą wodą. Ostatni etap sterylizacji polegał na umieszczeniu fragmentów roślin w sterylnych naczyniach z 15% roztworem Cloroxu, które wytrząsano przez 20 min. Następnie odlewano Clorox i przepłukiwano sterylną wodą (3 x po 10 min.).

### Inicjacja kultur, stabilizacja, selekcja

Izolacja pąków z wysterylizowanych eksplantatów odbywała się w komorze laminarnej w sterylnych warunkach. Pąki umieszczano na zestalonej agarze (8g/l) pożywce inicjalnej o składzie wg. Murashige i Skooga z dodatkiem 3% sacharozy. Odczyn pożywki ustalano za pomocą 1 M NaOH i 1 M HCl na poziomie pH 5,7 przed autoklawowaniem.

Stabilizacja kultur przez okres około 4 tygodni odbywała się w fitotronie w sterylnych warunkach, w którym utrzymywany jest fotoperiod 16 h/dzień, 8 h/noc oraz stała temperatura 23°C przy natężeniu światła 8 – 15 W/m<sup>2</sup>. W tym czasie eliminowano również kultury z zakażeniami.

### Namnażanie kultur

Otrzymane w kulturach inicjalnych pędy, dzielono i pasażowano na pożywkę namnożeńiową MS zawierającą benzyloamino purynę (BAP) w ilości 1 mg/l, kwas indolomastłowy (IBA) w ilości 0,1 mg/l, sacharozę 30g/l i 8 g/l agaru. Odczyn pożywki ustalano za pomocą 1 M NaOH i 1 M HCl na poziomie pH 5,7 przed autoklawowaniem. Pasaże powtarzano co 4 tygodnie do uzyskania pożądanej ilości pędów.

### Ukorzenie w warunkach sterylnych

Po namnożeniu właściwej ilości pędów, rośliny ukorzeniano na pożywce agarowej WPM z dodatkiem kwasu indolomastłowego (IBA) w ilości 1 mg/l i sacharozy 30 g/l. Czas ukorzeniania 4-5 tygodni.

### Aklimatyzacja i adaptacja do uprawy w podłożu glebowym

Ukorzenione sadzonki po wyjęciu z pojemników myto z pozostałości pożywki i sadzono do wielodoniczek wypełnionych podłożem (torf + perlit w stosunku 2:1). Następnie rośliny osłaniano specjalnymi foliowymi namiotami zapewniającymi wysoką wilgotność. Rośliny systematycznie podlewano i wietrzono stopniowo wydłużając im czas bez osłon foliowych. Aklimatyzacja trwała 4 tygodnie, w tym czasie sadzonki nawożono dwukrotnie preparatem Florovit (25 ml/10l). Dwumiesięczne rośliny przesadzano ze skrzynek do doniczek do dalszego wzrostu. Następnie rośliny te były przekazane do doświadczeń polowych.

Tabela. 1. Zoptymalizowana metodyka namnażania podkładki jabłoni P 68, obejmująca zaadoptowane i zmodyfikowane etapy inicjacji kultur tkankowych.

<b>Etap</b>	<b>Metodyka standardowa</b>	<b>Metodyka zmodyfikowana</b>
Materiał	Pąki kątowe/ wierzchołkowe	Pąki kątowe/ wierzchołkowe
Sterylizacja: - bieżąca woda - detergent/ bieżąca woda - 15% podchloryn sodu - sterylna woda	120 min. 40/ 30 min. 30 min. 3 x 10 min.	90 min. 30/ 20 min. 20 min. 3 x 10 min.
Inicjacja - pożywka - cytokinina (BAP) - auksyna (IBA) - stężenie sacharozy - pH - stabilizacja kultur	MS, (MgSO <sub>4</sub> - 360 mg/l) 1 mg/l 0,5 mg/l 30 g/l 5,7 6 tyg.	MS, (MgSO <sub>4</sub> - 180 mg/l) - - 30 g/l 5,7 4 tyg.
Namnażanie kultur - pożywka - cytokinina (BAP) - auksyna (IBA) - siarczan adeniny - stężenie sacharozy - pH - pasaż	MS, (MgSO <sub>4</sub> - 360 mg/l) 1,2 mg/l - 80 mg/l 30 g/l 5,7 Co 4 tyg.	MS, (MgSO <sub>4</sub> - 180 mg/l) 1 mg/l 0,1 mg/l - 30 g/l 5,7 Co 4 tyg.
Ukorzenianie - Pożywka - auksyna (IBA) - Phloroglucinol - Stężenie sacharozy - pH - czas ukorzeniania	WPM 1,5mg/l 80 mg/l 30 g/l 5,7 6 tyg.	WPM 1 mg/l - 30 g/l 5,7 4-5 tyg.