

# Ocena tożsamości genetycznej jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea*) podczas opracowywania metody rozmnażania w warunkach *in vitro*.

## Wstęp

Jagoda kamczacka (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) pochodząca z Dalekiego Wschodu jest najwcześniej owocującą rośliną jagodową w Polsce. Bardzo wytrzymała na mróz, a przy tym długowieczna, z powodzeniem może być wykorzystywana także w uprawie ekologicznej i integrowanej. Metoda *in vitro* jest jedną z najważniejszych technologii rozmnażania roślin pozwalająca na szybkie wprowadzenie na rynek nowych odmian. Istotnym zagadnieniem jest tożsamość genetyczna gatunków rozmnażanych tą metodą – powstające zmiany mogą mieć źródło epigenetyczne (przejściowe) lub genetyczne (trwałe mutacje DNA). Dotychczas nie opracowano systemu łączącego metodę rozmnażania *in vitro* z zabiegami mającymi na celu uzyskanie wysokiej jakości materiału rozmnożeniowego dla jagody kamczackiej, dlatego celem badań jest opracowanie systemu oceny jej tożsamości genetycznej i kondycji fizjologicznej na etapach inicjacji i stabilizacji kultur, namnażania *in vitro* oraz ich ukorzenia i aklimatyzacji *ex vitro*.

## Materiały i metody

Przeprowadzono ocenę tożsamości genetycznej jagody kamczackiej przed zainicjowaniem kultur oraz na etapie inicjacji i stabilizacji kultur z wykorzystaniem markerów ISSR i AFLP. Dokonano analizy polimorfizmu DNA z wykorzystaniem 23 starterów ISSR oraz 23 par starterów AFLP. Materiał stanowiły rośliny donorowe i mateczne dwóch odmian jagody kamczackiej 'Wojtek' oraz 'Zojka' utrzymywane w kulturach *in vitro* na pożywce MS zawierającej sacharozę w stężeniu 30 g l<sup>-1</sup>, 2iP 15 mg l<sup>-1</sup> + mT 1 mg l<sup>-1</sup> zestawionej agarem 2 g l<sup>-1</sup> + gelrite 1,2 g l<sup>-1</sup> (współczynnik namnażania 4,5 dla odmiany 'Zojka' oraz 5,6 dla odmiany 'Wojtek'). Przeprowadzono także ocenę tożsamości genetycznej na etapie ukorzenia roślin jagody kamczackiej w warunkach *in vitro*, w której wykorzystano startery w najwyższym stopniu różnicujące badane odmiany. Materiał stanowiły rośliny jagody kamczackiej odmiany 'Wojtek' oraz 'Zojka' ukorzeniane w kulturach *in vitro* na pożywce MS różniących się ilością regulatorów wzrostu IBA lub/i IAA.

## Wyniki

### Analiza ISSR

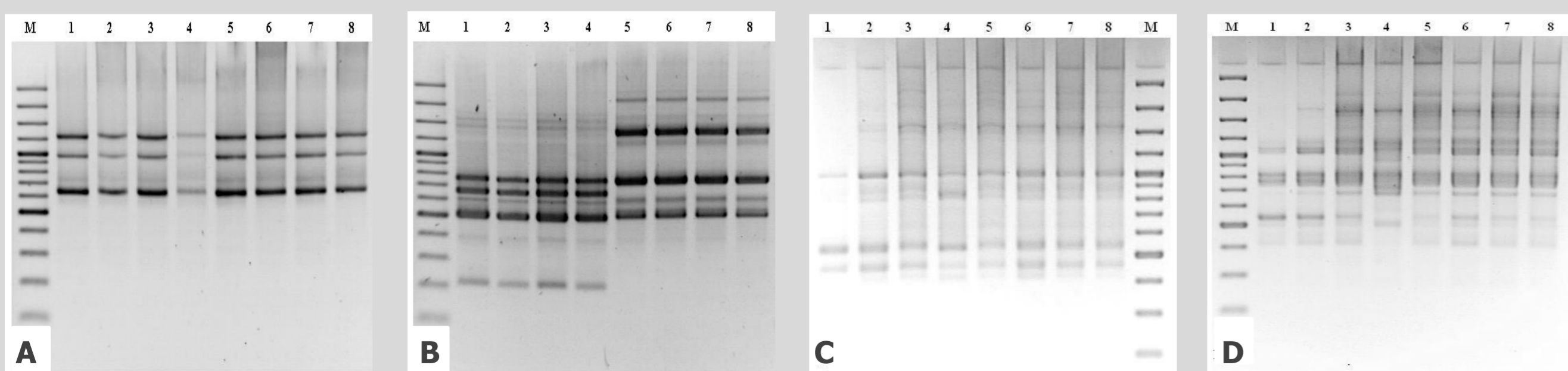
Z testowanych 23 starterów ISSR (UBC Primer Set) jedynie 14 generowało produkty amplifikacji w reakcji PCR. 4 startery (**825**, **810**, **827** oraz **865**) generowały polimorfizm prążkowy pomiędzy odmianami na poziomie – odpowiednio – 18,2%, 16,7%, 8,3% oraz 50%.

### Analiza AFLP

Z testowanych 23 par starterów AFLP 21 par generowało produkty amplifikacji w reakcji PCR. 4 pary starterów (**Pst-CC/Mse-CC**, **Pst-TT/Mse-CC**, **Pst-GC/Mse-TA**, **Pst-CG/Mse-AG**) generowały polimorfizm prążkowy na poziomie – odpowiednio – 30%, 13,3%, 11,1% oraz 4,8%.

Tabela. Analiza markerów ISSR oraz AFLP w roślinach matecznych jagody kamczackiej (‘-’ – brak produktów PCR).

numer startera ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	pary starterów AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]
		ogółem	polimorficzne				ogółem	polimorficzne	
806	-	-	-	-	Pst-TT/Mse-CC	900 – 250	30	4	13,3
<b>810</b>	1500 – 500	6	1	16,7	Pst-GC/Mse-GC	850 – 380	21	0	0
813	-	-	-	-	Pst-GC/Mse-TA	850 – 400	18	2	11,1
821	-	-	-	-	Pst-TA/Mse-TA	850 – 450	14	0	0
822	2000 – 400	9	0	0	Pst-TA/Mse-GC	850 – 200	42	0	0
823	2000 – 400	13	0	0	Pst-AG/Mse-AG	800 – 250	54	0	0
<b>825</b>	2000 – 200	11	2	18,2	Pst-AG/Mse-CG	780 – 250	36	0	0
<b>827</b>	2500 – 550	12	1	8,3	Pst-CG/Mse-AG	760 – 200	42	2	4,8
828	1200 – 1000	2	0	0	Pst-TC/Mse-TC	350 – 180	13	0	0
830	1700	1	0	0	Pst-TC/Mse-AT	400 – 330	2	0	0
834	900 – 400	3	0	0	Pst-AT/Mse-AT	330 – 100	5	0	0
840	1500 – 1000	2	0	0	Pst-AT/Mse-TC	350 – 50	25	0	0
843	1500 – 300	9	0	0	Pst-AA/Mse-AA	250 – 80	13	0	0
846	1700 – 800	3	0	0	Pst-AA/Mse-AC	300 – 50	37	0	0
853	2000 – 500	6	0	0	Pst-AC/Mse-AC	200 – 80	12	0	0
848	-	-	-	-	Pst-AC/Mse-AA	280 – 130	8	0	0
849	-	-	-	-	Pst-GG/Mse-GG	-	-	-	-
855	1500 – 500	4	0	0	Pst-GG/Mse-GA	-	-	-	-
858	-	-	-	-	Pst-GA/Mse-GA	350 – 100	19	0	0
<b>865</b>	1500 – 500	6	3	50,0	Pst-GA/Mse-GC	330 – 150	9	0	0
867	-	-	-	-	Pst-CC/Mse-CC	300 – 80	20	6	30,0
875	-	-	-	-	Pst-CC/Mse-GG	360 – 60	43	0	0
881	-	-	-	-	Pst-TT/Mse-CC	450 – 50	48	0	0



Fot. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych jagody kamczackiej dwóch odmian: 'Wojtek' (1,2,3,4) i 'Zojka' (5,6,7,8) wykonanych techniką ISSR-PCR przy zastosowaniu starterów: A – 810, B – 825, C – 822, D – 823. Wzorzec masowy (M) – 100bp DNA Ladder (Fermentas).

### Analiza tożsamości genetycznej na etapie ukorzenia *in vitro*

Do analiz wykorzystane zostały 4 startery ISSR wytypowane we wcześniejszych analizach jako najbardziej różnicujące odmiany jagody kamczackiej (825, 810, 827, 865).

U roślin odmiany 'Wojtek' podczas analiz ISSR nie zaobserwowano zmienności genetycznej wywołanej zmianą warunków w kulturach *in vitro* podczas ukorzenia na pożywkach o różnym składzie w porównaniu do roślin kontrolnych rosnących na pożywce podstawowej MS.

U roślin odmiany 'Zojka' zaobserwowano zjawisko zmienności w kulturach *in vitro* jedynie u roślin rosnących na pożywkach z dodatkiem IAA (S5, S8, S9, S10 oraz S11) na poziomie 50%.

Tabela. Skład pożywki podczas ukorzenia w kulturach *in vitro* jagody kamczackiej.

nr pożywki ('Zojka'/'Wojtek')	skład pożywki
S1/M1	IBA 0,1 mg/L
S4/M4	IBA 4,0 mg/L
S5/M5	IAA 0,1 mg/L
S8/M8	IAA 4,0 mg/L
S9/M9	IBA 0,1 mg/L + IAA 0,1 mg/L
S10/M10	IBA 1,0 mg/L + IAA 1,0 mg/L
S11/M11	IBA 2,5 mg/L + IAA 4,0 mg/L
S0/ M0	brak IBA lub/i IAA
pożywka podstawowa MS (kontrola)	



Tabela. Analiza markerów ISSR podczas ukorzenia roślin jagody kamczackiej w warunkach *in vitro*.

Wojtek					Zojka						
nr pożywki	starter ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	nr pożywki	starter ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]
			ogółem	polimorficzne					ogółem	polimorficzne	
M1	825	500 – 1000	3	0	0	S1	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	300 – 700	2	1	50,0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 700	3	0	0
M4	825	500 – 1000	3	0	0	S4	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	300 – 700	2	1	50,0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 700	3	0	0
M5	825	500 – 1000	3	0	0	S5	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	700	1	0	0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 2000	6	3	50,0
M8	825	500 – 1000	3	0	0	S8	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	700	1	0	0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 2000	6	3	50,0
M9	825	500 – 1000	3	0	0	S9	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	700	1	0	0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 2000	6	3	50,0
M10	825	500 – 1000	3	0	0	S10	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	700	1	0	0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 2000	6	3	50,0
M11	825	500 – 1000	3	0	0	S11	825	500 – 1000	3	0	0
	810	600 – 1300	4	0	0		810	-	-	-	-
	827	700	1	0	0		827	200 – 700	3	0	0
	865	300 – 1400	6	0	0		865	300 – 2000	6	3	50,0