

**Ocena zdrowotności, wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń
mikrobiologicznych oraz ocena czystości odmianowej i tożsamości
genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kamiczackiej i czosnku
na etapie namnażania kultur *in vitro***

Opracowanie zbiorowe pod redakcją: dr Agnieszka Wojtania

Autorzy opracowania:

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

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 2017

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cel zadania
- III. Gatunki i odmiany roślin ogrodniczych, na których prowadzone są badania
- IV. Ukorzenianie metodą *in vitro* (w przypadku czosnku także proces formowania cebul) truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku
- V. Ocena zdrowotności materiału roślinnego pod względem obecności patogenicznych wirusów, bakterii i grzybów, w trakcie ukorzeniania metodą *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku
- VI. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie ukorzeniania metodą *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku
- VII. Ocena wzrostu i rozwoju roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku oraz ich kondycji fizjologicznej podczas ukorzeniania metodą *in vitro*
- VIII. Ocena tożsamości genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku podczas ukorzeniania metodą *in vitro*.
- IX. Podsumowanie i wnioski
- X. Literatura
- XI. Zespół badawczy

I. Wstęp

Metoda *in vitro* jest jedną z alternatywnych technologii rozmnażania roślin stosowanych w produkcji ogrodniczej. Metoda ta wykorzystywana jest w produkcji elitarnego materiału szkółkarskiego (przedbazowego i bazowego) 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.

W ostatnich latach, coraz częściej wymagane są certyfikaty jakości i zdrowotności mikrosadzonek (lub 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 metodą *in vitro* gatunków i odmian roślin ogrodniczych.

II. Cel badań

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

III. 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* Sevast), odmiany 'Wojtek' i 'Zojka'

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

IV. Ukorzenie metodą *in vitro* (w przypadku czosnku także proces formowania cebul) truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku

Ukorzenie pędów jest niezwykle ważnym i trudnym etapem w procesie masowego rozmnażania roślin *in vitro*. Wyprodukowanie dużej ilości mikrosadzonek o małych zdolnościach do ukorzenia może prowadzić do poważnych strat finansowych i braku dostępności oczekiwanego materiału roślinnego. Bardzo istotna jest zatem wiedza na temat czynników wpływających na efektywne ukorzenie poszczególnych genotypów.

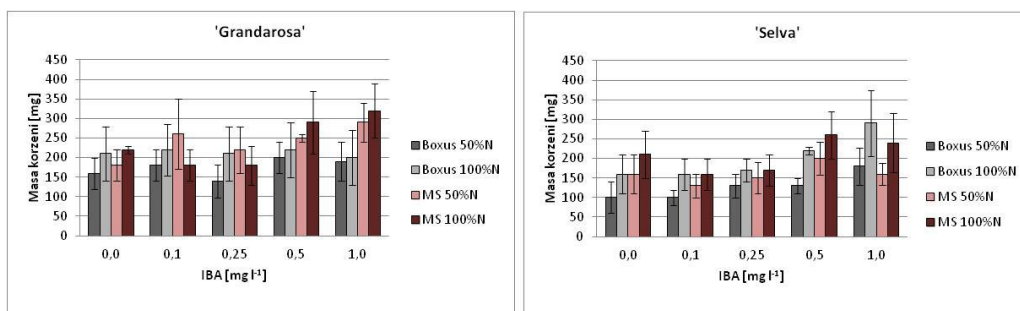
W roku 2017 badano wpływ auksyn (rodzaj i stężenie), zróżnicowanego poziomu soli azotowych, węglowodanów, pH pożywki i temperatury na ukorzenie pędów *in vitro*.

Truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch.)

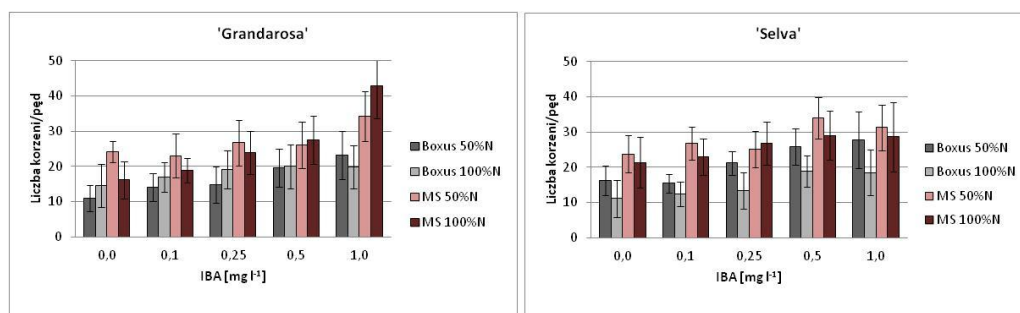
Celem badań była ocena ukorzenia mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' rosnących na pożywkach wg Boxusa (1974) i Murashige i Skooga (MS, 1962) w zależności od stężenia IBA (0,1-1,0 mg·L⁻¹) i zawartości azotu (100 i 50%) w pożywce (doświadczenie 1) oraz w zależności od rodzaju cukru (glukoza i sacharoza) i jego zawartości (10, 20, 30 i 40 g·L⁻¹) w pożywce (doświadczenie 2). Podczas ukorzenia pędy umieszczone były w temperaturze

23±2°C, na świetle białym o natężeniu napromieniowania 40 μmol m⁻² s⁻¹ i 16-godzinnym fotoperiodzie.

Doświadczenie 1. Wykazano, że pędy badanych odmian mają wysoką zdolność do ukorzenia w warunkach *in vitro*. Uzyskano 100% ukorzenionych pędów zarówno na pożywce wg Boxusa jak i MS bez auksyny. Dodanie IBA (w sposób zależny od stężenia) skutkowało znaczącym wzrostem liczby korzeni i świeżej masy korzeni, szczególnie u odmiany 'Grandarosa' (Rys. 1 i 2). Na intensywność tworzenia korzeni i ich wzrost istotnie wpływał rodzaj pożywki mineralnej i poziom azotu. Pędy obu odmian tworzyły więcej korzeni na pożywce MS niż na pożywce wg Boxusa. W przypadku odmiany 'Selva', czynnikiem stymulującym tworzenie korzeni było obniżenie soli azotowych do 50%.

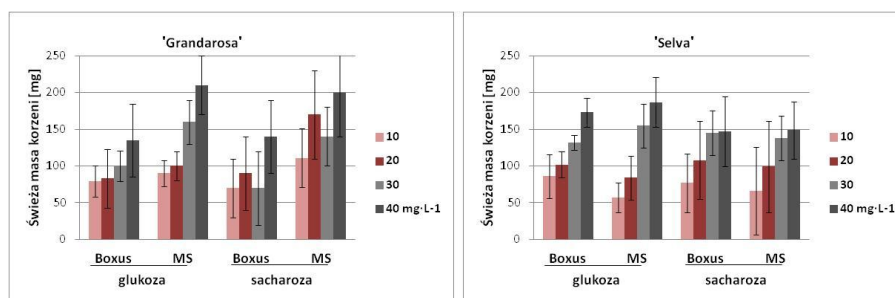


Rys. 1. Wpływ poziomu soli azotowych (50%, 100%) w pożywkach wg. Murashige i Skooga oraz Boxusa i stężenia auksyny (IBA) na świeżą masę korzeni truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.



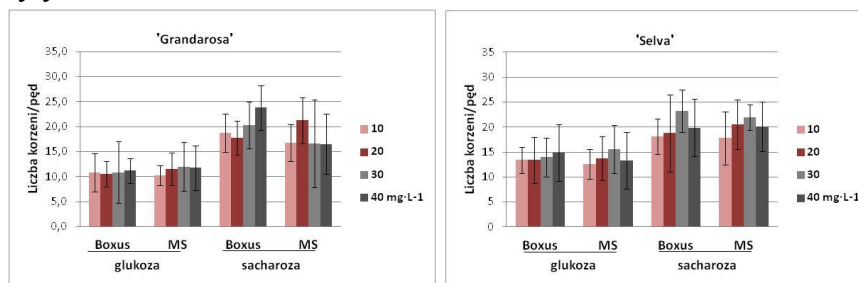
Rys. 2. Wpływ poziomu soli azotowych (50%, 100%) w pożywkach wg. Murashige i Skooga oraz Boxusa i stężenia auksyny (IBA) na ukorzenie pędów truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.

Doświadczenie 2. Wyniki kolejnego doświadczenia wykazały, iż czynnikiem stymulującym przyrost świeżej masy i wzrost korzeni było wzrastające stężenie cukru od 10 do 40 g·L⁻¹ (Rys. 3 i 5). U odmiany 'Selva', masa korzeni była wyższa w obecności glukozy, natomiast u odmiany 'Grandarosa' większy przyrost świeżej masy korzeni obserwowano na pożywce MS niż na pożywce wg Boxusa (Rys. 3).

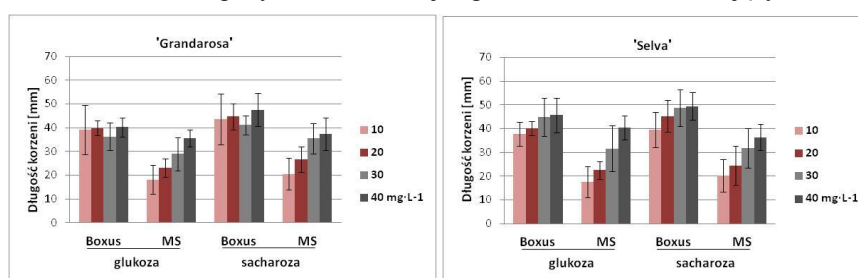


Rys. 3. Wpływ stężenia i rodzaju cukru (glukoza, sacharoza) na świeżą masę korzeni truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro* na pożywce mineralnej wg Boxusa i MS zawierających 50% soli azotowych i 0,1 mg·L⁻¹.

Niezależnie od pożywki mineralnej, więcej korzeni tworzyło się pod wpływem sacharozy niż glukozy (Rys. 4). Pędy obu odmian truskawki ukorzeniane na pożywce wg Boxusa posiadały dłuższe i grubsze korzenie, zwykle o zabarwieniu różowym. Na pożywce MS korzenie najczęściej były kremowe lub szare.



Rys. 4. Wpływ stężenia i rodzaju cukru (glukoza, sacharoza) na liczę ukorzenianie pędów truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro* na pożywce mineralnej wg Boxusa i MS zawierających 50% soli azotowych i 0,1 mg·L⁻¹.



Rys. 5. Wpływ stężenia i rodzaju cukru (glukoza, sacharoza) na długość korzeni tworzących się na pędach truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro* na pożywce mineralnej wg Boxusa i MS zawierających 50% soli azotowych i 0,1 mg·L⁻¹.

Malina (*Rubus idaeus* L.)

Wykonano 3 doświadczenia: dla określenia wpływu stężenia auksyny (IBA) oraz dla określenia wpływu biocydów na ukorzenianie maliny 'Polka' i 'Polana'. Ukorzenianie prowadzono na pożywce MS, zawierającej 30 g·L⁻¹ sacharozy i 7 g·L⁻¹ agaru (Plant agar). W każdym doświadczeniu było 30 pędów, po 6 w 5 słoikach.

Wykazano, że obydwie odmiany mają wysoką zdolność do ukorzeniania w zastosowanych warunkach i ukorzeniają się także bez dodatku auksyny. Jednak dodanie już 0,25 mg·L⁻¹ IBA znacząco zwiększało udział ukorzenionych pędów i liczbę korzeni. Najkorzystniejsze dla odmiany Polka było stężenie 0,75 mg·L⁻¹, a dla odmiany Polana 0,5 mg·L⁻¹ IBA (Tab. 1). Wykazano, że dodatek biocydów ani obniżenie pH do wartości 4,0 nie wpływają znacząco na wyniki ukorzeniania. Tylko dodatek 50 mg·L⁻¹ ryfampicyny zwiększył udział ukorzenionych pędów i liczbę korzeni obu odmian (Tab. 2). Biocydy zapewne ograniczały obecność bakterii, ale ich nie eliminowały. Wszystkie wyłożone fragmenty korzeni na pożywkę bakteryjną NA wykazywały obecność bakterii.

Wnioski:

1. Pożywka MS z witaminami i dodatkiem 30 g·L⁻¹ sacharozy oraz IBA w stężeniu od 0,5 do 1 mg·L⁻¹ jest właściwa do ukorzeniania *in vitro* maliny 'Polka' i 'Polana'
2. Wartość pH 5,7 i 4,0 nie ma znaczącego wpływu na ukorzenianie
3. Dodatek biocydów PPM 0,2% i ryfampicyny 50 mg·L⁻¹ ograniczających populację bakterii w kulturach obu odmian nie obniżają kondycji kultur na etapie ukorzeniania a ryfampicyna zwiększa udział pędów ukorzenionych i liczbę korzeni

Tabela 1. Wpływ stężenia auksyny na ukorzenie maliny ‘Polka’ i ‘Polana’

Stężenie IBA [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	% ukorzenionych pędów	Liczba korzeni	Udział korzeni > 1 cm [%]	Wysokość pędu [cm]
‘Polka’				
0	83	3,1	83	4,0
0,25	87	4,5	73	4,3
0,50	97	5,9	46	4,1
0,75	97	8,4	56	4,5
1,0	93	4,2	41	3,7
1,5	83	6,0	39	3,3
średnia	90	5,4	56	4,0
‘Polana’				
0	47	1,4	72	2,7
0,25	97	4,5	55	3,5
0,50	93	5,8	53	4,0
0,75	87	5,8	35	3,3
1,0	90	4,7	33	3,3
1,5	87	4,5	31	3,0
średnia	84	4,5	47	3,3

Tabela 2. Wpływ biocydów na ukorzenie maliny ‘Polka’ i ‘Polana’ na pożywce agarowej zawierającej $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, pożywka MS z witaminami, $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sacharozy, $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agaru.

Kombinacje	% ukorzenionych pędów	Liczba korzeni	Udział korzeni > 1 cm (%)	Długość pędu [cm]
‘Polka’				
Kontrola	88	4,8	73	4,1
+ 0,2% PPM	83	4,8	65	4,0
+ Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	98	6,2	85	5,1
‘Polana’				
Kontrola	93	6,0	87	5,5
+ 0,2% PPM	93	5,5	71	7,1
+ Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100	7,0	81	5,6

Tabela 3. Wpływ wartości pH i biocydów na ukorzenie maliny ‘Polka’ i ‘Polana’ na pożywce agarowej MS zawierającej $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA

Kombinacje	% ukorzenionych pędów	Liczba korzeni	Udział korzeni > 1 cm (%)	Długość pędu [cm]
‘Polka’				
pH 5,7	94	6,5	93	4,5
pH 4,0	97	7,4	68	4,6
pH 5,7; 0,2% PPM;	97	6,3	74	4,8
pH 4,0; 0,2 PPM;	91	5,6	65	4,8
pH 5,7; Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;	100	6,8	62	4,4
pH 4,0; Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;	97	8,7	50	4,4
‘Polana’				
pH 5,7	89	5,7	74	6,0
pH 4,0	88	6,2	68	5,0
pH 5,7; 0,2% PPM;	94	6,4	77	5,4
pH 4,0; 0,2 PPM;	95	6,6	71	5,2
pH 5,7; Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100	7,5	75	5,6
pH 4,0; Ryf. $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100	7,0	67	5,3

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

Materiałem badawczym były pojedyncze pędy (20-25 mm) pochodzące z rozmnażania *in vitro*. Kultury pędów mnożono na pożywce podstawowej Murashige i Skooga (1962) zawierającej 2iP (15 mg·L⁻¹) i mT (1 mg·L⁻¹) zestalone agarem Biocorp 2 g·L⁻¹+ Gelrite 1 g·L⁻¹, pH 5.6. Badano wpływ auksyn (rodzaj i stężenie) na ukorzenie pędów jagody kamczackiej *in vitro*. Zastosowano dwie auksyny - kwas indolilo-3-octowy (IAA) oraz kwas indolilo-3-masłowy (IBA) w różnych stężeniach i kombinacjach:

1. Kontrola (MS bez auksyn)
2. IBA 0,1 mg·L⁻¹
3. IBA 1,0 mg·L⁻¹
4. IBA 2,5 mg·L⁻¹
5. IBA 4,0 mg·L⁻¹
6. IAA 0,1 mg·L⁻¹
7. IAA 1,0 mg·L⁻¹
8. IAA 2,5 mg·L⁻¹
9. IAA 4,0 mg·L⁻¹
10. IBA 0,1 mg·L⁻¹+IAA 0,1 mg·L⁻¹
11. IBA 1,0 mg·L⁻¹+IAA 1,0 mg·L⁻¹
12. IBA 2,5 mg·L⁻¹+IAA 4,0 mg·L⁻¹

Wykazano, iż ukorzenie pędów jagody kamczackiej *in vitro* zależy od odmiany oraz rodzaju i stężenia auksyny. Wyższą zdolność do ukorzenia wykazywała odmiana ‘Zojka’ niż ‘Wojtek’ (Rys. 6 i 7). Pojawianie się pierwszych korzeni obserwowano po 2 tygodniach wzrostu na pożywce. U obu odmian, 100% ukorzenionych pędów uzyskano na pożywce zawierającej 4 mg·L⁻¹ IBA (Tab. 4). Wraz ze wzrostem stężenia auksyny następował wzrost liczby korzeni na pędzie. Najwięcej korzeni tworzyło się w obecności IBA (2,5 mg·L⁻¹) + IAA (4,0 mg·L⁻¹); 6,2 korzeni/pęd u odmiany ‘Zojka’ i 4,0 korzeni/pęd u odmiany ‘Wojtek’ (Tab. 4). U obu odmian, auksyny stymulowały wzrost korzeni. Najdłuższe korzenie obserwowano w obecności 2,5 mg·L⁻¹ IBA oraz 4 mg·L⁻¹, u odmiany ‘Zojka’ o długości 23,6 mm i 21,7 mm i odmiany ‘Wojtek’ odpowiednio 27,9 mm i 33,0 mm (Tab. 4). Na pożywce z IBA 2,5 i 4,0 mg·L⁻¹ korzenie były nie tylko długie, ale również grube, o wysokiej masie.

Tabela 4. Wpływ auksyn na ukorzenie jagody kamczackiej ‘Zojka’ i ‘Wojtek’

Lp.	% ukorzenionych pędów		Liczba korzeni/pęd		Długość korzeni [mm]		Masa korzeni [mg]	
	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’
1.	40	4	0,5	0,1	7,4	1,6	3,5	0,6
2.	40	4	0,5	0,1	16,6	1,5	5,8	0,4
3.	76	40	1,8	0,8	17,7	12,5	24,9	12,6
4.	96	64	4,5	2,4	23,6	27,9	61,5	59,4
5.	100	100	5,1	3,9	21,7	33,0	73,5	73,9
6.	64	20	0,9	0,2	16,8	5,2	6,7	3,2
7.	100	56	2,6	1,0	13,2	12,9	10,1	7,2
8.	100	80	3,9	2,2	11,9	17,4	12,4	15,0
9.	100	92	4,5	2,9	14,7	20,5	22,1	16,4
10.	48	12	0,9	0,2	12,8	2,9	7,8	0,8
11.	100	88	3,6	2,4	20,3	18,7	19,2	15,0
12.	100	88	6,2	4,0	18,7	14,4	43,0	20,6

W kolejnym doświadczeniu badano wpływ cukrów (sacharoza, glukoza), temperatury (15°C i 23°C) i soli azotowych (KNO₃, NH₄NO₃ odpowiednio 100%, 50% i 25% wg MS) w obecności auksyny na ukorzenie dwóch odmian jagody kaczackiej ‘Zojka’ i ‘Wojtek’.

Traktowania:

Sacharoza

13. Sacharoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

14. Sacharoza 30 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

15. Sacharoza 50 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

Glukoza

16. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

17. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

18. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

Temperatura 15°C±1

19. 100% KNO₃, 100% NH₄NO₃+IBA 0,5 mgL⁻¹

20. 50% KNO₃, 50% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

21. 25% KNO₃, 25% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

Temperatura 23°C±1

22. 100% KNO₃, 100% NH₄NO₃+IBA 0,5 mgL⁻¹

23. 50% KNO₃, 50% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

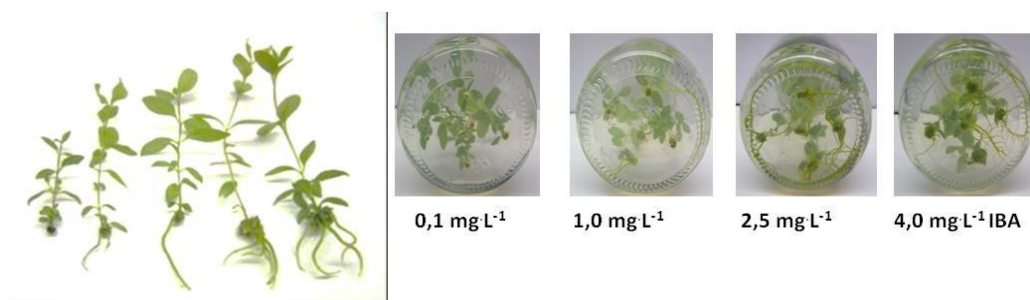
24. 25% KNO₃, 25% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

Generalnie, więcej ukorzenionych pędów uzyskano na pożywce z sacharozą niż glukozą (wyjątek glukoza 30 gL⁻¹ u odmiany ‘Wojtek’). Liczba ukorzenionych pędów zależała także od zawartości soli azotowych w pożywce. Zmniejszenie soli azotowych do 50 i 25% wg MS wpływało stymulująco na ukorzenianie pędów. Wyższa temperatura sprzyjała ukorzenianiu się pędów odmiany ‘Wojtek’. Rodzaj cukru nie miał wpływu na liczbę korzeni na pędzie u obu odmian ‘Zojka’. Najwięcej korzeni (3,2 korzeni/pęd) stwierdzono u roślin jagody kaczackiej odmiany ‘Zojka’ na pożywce zawierającej cukier w stężeniu 50 gL⁻¹ (Tab. 5). Temperatura i sole azotowe nie miały wpływu na liczbę korzeni. Wyższa temperatura (23°C), w obecności 0,5 mgL⁻¹ IBA sprzyjała tworzeniu tkanki kalusowej, której nie obserwowano u pędów rosnących w temp. 15°C.

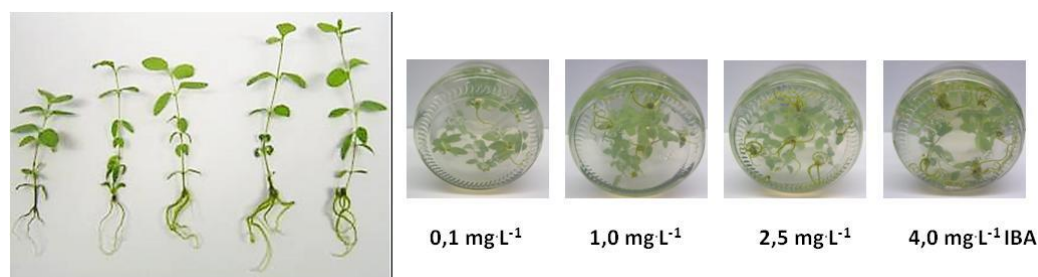
Tabela 5. Wpływ cukrów, soli azotowych i temperatury na ukorzenianie jagody kaczackiej ‘Zojka’ i ‘Wojtek’

L.p.	% ukorzenionych pędów		Liczba korzeni/pęd		Długość korzeni [mm]		Masa korzeni [mg]	
	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’
Sacharoza								
13.	64	56	1,9	1,7	10,7	10,6	13,1	13,6
14.	84	68	2,5	2,3	20,7	16,5	46,0	40,3
15.	52	48	3,2	2,2	14,7	11,9	33,8	27,8
Glukoza								
16.	52	33	2,0	1,8	9,9	9,5	8,3	16,6
17.	60	80	2,8	3,3	7,4	8,6	18,1	22,3
18.	8	24	3,0	2,7	15,6	7,0	20,0	21,8
Temperatura 15°C, Sole azotowe 100%, 50% i 25% wg MS								
19.	68	44	2,4	1,5	7,9	5,4	11,8	9,5
20.	80	76	2,3	2,4	7,8	7,9	8,3	19,8
21.	92	72	2,8	2,4	7,9	9,8	12,7	16,7
Temperatura 23°C, Sole azotowe 100%, 50% i 25% wg MS								
22.	64	76	1,6	2,6	12,8	11,1	16,1	47,7
23.	84	84	2,1	2,9	19,8	14,6	40,9	48,4
24.	92	84	2,1	2,1	20,0	16,3	57,4	39,3

U obu odmian, długość korzeni oraz ich masa zależały od rodzaju i stężenia cukru. Najdłuższe korzenie uzyskano po zastosowaniu sacharozy w stężeniu $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Wyższa temperatura (23°C) wpływała na tworzenie dłuższych, bardziej rozgałęzionych korzeni o wyższej masie w porównaniu do korzeni rosnących w temperaturze 15°C . Obniżenie soli azotowych do 50% i 25% wg MS wpływało na długość korzeni (wyjątek 'Zojka' w temp. 15°C) i ich masę (Tab. 5).



Rys. 6. Wpływ różnych stężeń IBA na ukorzenianie pędów jagody kaczackiej odm. 'Wojtek' *in vitro*



Rys. 7. Wpływ różnych stężeń IBA na ukorzenianie pędów jagody kaczackiej odm. 'Zojka' *in vitro*

Czosnek (*Alium sativum* L.)

W roku 2017 prowadzono doświadczenia nad wpływem cytokinin (kinetyny, BAP i TDZ) oraz auksyn (NAA, IAA) na proces ryzogenezy i cebulowania dwóch odmian czosnku 'Ornak' i 'Jarus'. Regulatory wzrostu (w różnych kombinacjach i stężeniu) dodawano do pożywki B5 (Gamborg 1968) zawierającej $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sacharozy, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agaru, o pH 5,8. Celem eliminacji pojawiających się infekcji bakteryjnych do pożywek dodawano PPM (Plant Preservative Mixture) w stężeniu 0,1 lub 0,2%. Materiałem roślinnym użytym do doświadczeń były rozety bez korzeni. Wykonane po 4 tygodniach pomiary obejmowały liczbę (%) ukorzenionych pędów, liczbę i długość korzeni. Celem wywołania procesu cebulowania wydłużano czas wzrostu na pożywce ukorzeniającej do 6-8 tygodni.

U odmiany 'Ornak' najwięcej ukorzenionych pędów (25,4%) i najwięcej korzeni na pędzie (4,2) uzyskano na pożywce zawierającej TDZ i NAA w stężeniu $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tab. 6 i 8). Pędy odmiany 'Jarus' najlepiej ukorzeniały się (21,4 %) w obecności $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetyny podanej łącznie z NAA w stężeniu $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Na pożywkach oznaczonych numerem 6,7,8,9 (Tab. 6) obserwowano zamieranie eksplantatów.

Tabela 6. Wpływ regulatorów wzrostu na liczbę ukorzenionych pędów [%] odm. ‘Ornak’ *in vitro*.

Rodzaj eksplantatu		Rodzaj pożywki								
		1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*
Rozeta	z korzeniami	4,9	24,1	2,5	25,4	5,8	0,0	0,0	4,8	0,0
	bez korzenia	51,2	56,9	25,0	44,8	72,1	41,9	63,2	4,8	18,5
	kalusowata	6,1	1,7	20,0	3,0	1,2	0,0	0,0	14,3	3,7
	zaczątek	36,6	17,2	52,5	26,9	19,8	45,2	29,0	38,1	18,5
	zdeformowana	1,2	0,0	0,0	0,0	1,2	12,9	7,8	0,0	0,0
Kalus		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,0	59,3

* objaśnienia Tab.7

Tabela 7. Wpływ regulatorów wzrostu na liczbę ukorzenionych pędów [%] czosnku odm. ‘Jarus’ *in vitro*.

Rodzaj eksplantatu		Rodzaj pożywki								
		1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*
Rozeta	z korzeniami	5,6	2,4	1,9	21,1	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	bez korzenia	27,8	41,0	31,1	36,8	26,8	0,0	0,0	0,0	0,0
	kalusowata	11,1	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	zaczątek	50,0	24,1	52,8	34,2	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	zdeformowana	5,6	12,0	0,9	2,6	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Kalus		19,3	0,0	13,2	5,3	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0

1*– 10 mg·L⁻¹ Kin, 0,1 mg·L⁻¹NAA

2*– 1 mg·L⁻¹ BAP, 0,2% PPM

3*– 1 mg·L⁻¹ TDZ, 1 mg·L⁻¹ NAA, 0,2% PPM

4*– 0,1 mg·L⁻¹ TDZ, 0,1 mg·L⁻¹ NAA, 0,2% PPM

5*– 10 mg·L⁻¹ Kin, 0,1 mg·L⁻¹ NAA, 0,2% PPM

6*– 0,1 mg·L⁻¹ TDZ, 0,1 mg·L⁻¹ NAA 0,7 mg·L⁻¹ *meta*-topolina, 0,1% PPM

7*– 0,1 mg·L⁻¹ TDZ, 0,1 mg·L⁻¹ NAA, 0,2 mg·L⁻¹ BAP, 0,1% PPM

8*– 0,2 mg·L⁻¹ BAP,

9* –10 mg·L⁻¹ Kin, 2 mg·L⁻¹ IAA

Tworzenie cebul u odmiany ‘Ornak’ było najbardziej intensywne (4,8%) na pożywce zawierającej 10 g·L⁻¹ kinetyny i 0,1 g·L⁻¹ NAA. U odmiany ‘Jarus’, cebulowanie obserwowano u 37,5% eksplantatów na pożywce uzupełnionej 1,0 g·L⁻¹ BAP.

Tabela 8. Wpływ regulatorów wzrostu w pożywce B5 na liczbę i długość korzeni mikrosadzonek czosnku odmiany ‘Ornak’ i ‘Jarus’

Regulatory wzrostu [mg·L ⁻¹]	‘Ornak’		‘Jarus’	
	Liczba korzeni	Długość [cm]	Liczba korzeni	Długość [cm]
10 Kin; 0,1 NAA	4,0	13,4	2,7	3,4
1 BAP; +PPM	2,5	6,4	3,5	18,0
1TDZ; 1 NAA; +PPM	4,2	7,1	6,5	16,5
0,1 TDZ; 0,1 NAA; +PPM	3,7	6,3	3,8	13,9
10 Kin; 0,1 NAA; +PPM	3,5	8,7	2,6	9,4

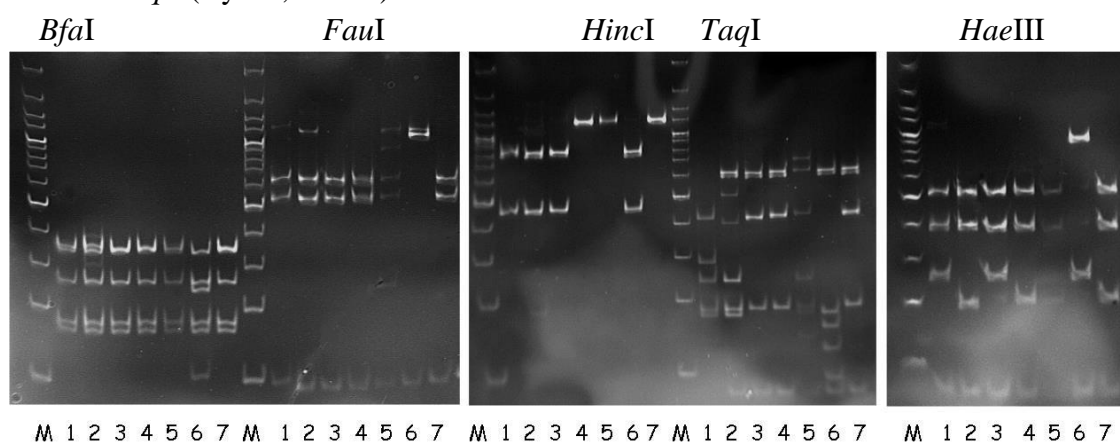
V. Ocena zdrowotności materiału roślinnego pod względem obecności patogenicznych wirusów, bakterii i grzybów, w trakcie ukorzenia metodą *in vitro* truskawki, maliny, jagody kaczuskiej, czosnku;

Truskawka (*Fragaria* × *ananasa* Duch.)

Badano obecność wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*, SMOV), wirusa marszczycy truskawki (*Strawberry crinkle virus*, SCrV), wirusa łagodnej żółtaczki brzegów liści truskawki (*Strawberry mild yellow edge virus*, SMYEV) i wirusa otaśmienia nerwów truskawki (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) w materiale roślinnym w trakcie ukorzenia metodą *in vitro* truskawki. W tym celu, z prób liści pobranych z pięciu kultur truskawki odm. 'Grandarosa' i pięciu kultur truskawki odm. 'Selva' izolowano kwasy nukleinowe metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (SC). W następnym etapie posłużyły one do syntezy i amplifikacji fragmentów cDNA wymienionych wirusów z wykorzystaniem techniki RT-PCR i specyficznych starterów. Produkty reakcji były rozdzielane elektroforetycznie w żelu agarozowym, barwione bromkiem etydyny i analizowane w świetle UV. W sumie wykonano 40 testów (2 odmiany × 5 prób × 4 wirusy). W badanych próbach nie wykryto żadnego z wymienionych wirusów.

Prowadzono również badania, których celem była ocena zróżnicowania właściwości biologicznych i genetycznych izolatów wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki utrzymywanych w roślinach *Fragaria vesca* lub *F. virginiana* sztucznie zakażonych izolatami SMOV z truskawki odm. 'Grandarosa' oraz sześcioma innymi polskimi izolatami tego wirusa. RT-PCR przeprowadzono z zastosowaniem własnych starterów specyficznych dla fragmentu RNA2 SMOV, a następnie analizowano długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) po trawieniu uzyskanych produktów RT-PCR enzymami. Fragmenty RNA2 zsekwencjonowano, a odczytane sekwencje analizowano przy użyciu programów Lasergene 7.1 (DNASTAR). Analizę filogenetyczną badanych sekwencji nukleotydów RNA2 wirusa oraz czterech analogicznych sekwencji SMOV zdeponowanych w GenBank, przeprowadzono metodą największej wiarygodności wykorzystując program MEGA 5.2. Jako grupy zewnętrznej użyto sekwencji RNA2 *Satsuma dwarf virus* (nr dostępu GenBank: AB009959).

Analiza RFLP wykazała zróżnicowanie w obrębie fragmentu RNA2 badanych izolatów SMOV. Uzyskano sześć różnych profili po trawieniu produktów RT-PCR enzymami *Bfa*I, *Fau*I, *Hae*III, *Hinc*I i *Taq*I. (Rys. 8, Tab. 9).



Rys. 8. Rozdział elektroforetyczny fragmentów RNA2 izolatów SMOV po trawieniu enzymami *Bfa*I, *Fau*I, *Hinc*I, *Taq*I i *Hae*III. M - marker wielkości, 1 - CRR, 2 - Grandarosa, 3 - Markat, 4 - Pink Rosa, 5 - karkas 1.4, 6 - Pegat, 7 - Granat

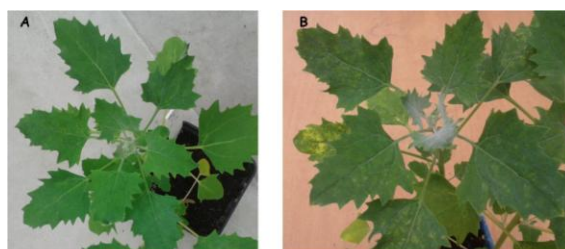
Tabela 9. Zróżnicowanie profili restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu fragmentów RNA2 izolatów wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (SMoV).

Izolat/enzym	<i>Bfa</i> I	<i>Fau</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinc</i> I	<i>Taq</i> I	Profil
CRR	A	A	A	A	A	I
Grandarosa	A	B	B	A	B	II
Markat	B	B	A	A	C	III
Pink Rosa	B	B	B	B	C	IV
Karkas 1.4	B	B	B	B	B	V
Pegat	C	C	C	A	D	VI
Granat	B	B	B	B	C	IV

Podobieństwo sekwencji fragmentu RNA2 o długości 1982 nukleotydów izolatu SMoV z truskawki odm. Grandarosa oraz 6 innych polskich izolatów tego wirusa wynosiło 93-98%. Wykazano, że badane izolaty były podobne w 89-93% do analogicznych sekwencji szczepów wirusa z Holandii (GenBank: AJ311876) i Kanady (KU200454, KU200459, KU177219).

W celu oceny reakcji na porażenie izolatami SMoV, rośliny *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* ‘Samsun’, *N. occidentalis* 37B i *N. benthamiana* inokulowano mechanicznie sokiem z liści *F. vesca* lub *F. virginiana* zakażonych badanymi izolatami wirusa.

Wyraźne zmiany chorobowe obserwowano jedynie po inokulacji sokiem z liści poziomek zakażonych izolatem Markat. W przypadku innych izolatów wirusa, na *C. quinoa* występowały tylko niewielkie przebarwienia, albo nie obserwowano żadnych objawów (Rys. 9). Wyniki tych badań świadczą o zróżnicowaniu właściwości biologicznych izolatów SMoV. Wykorzystując technikę RT-PCR, potwierdzono obecność SMoV w inokulowanych *C. quinoa*. W roślinach pozostałych gatunków *Chenopodium* i *Nicotiana* nie wykryto wirusa i nie obserwowano też na nich objawów chorobowych.



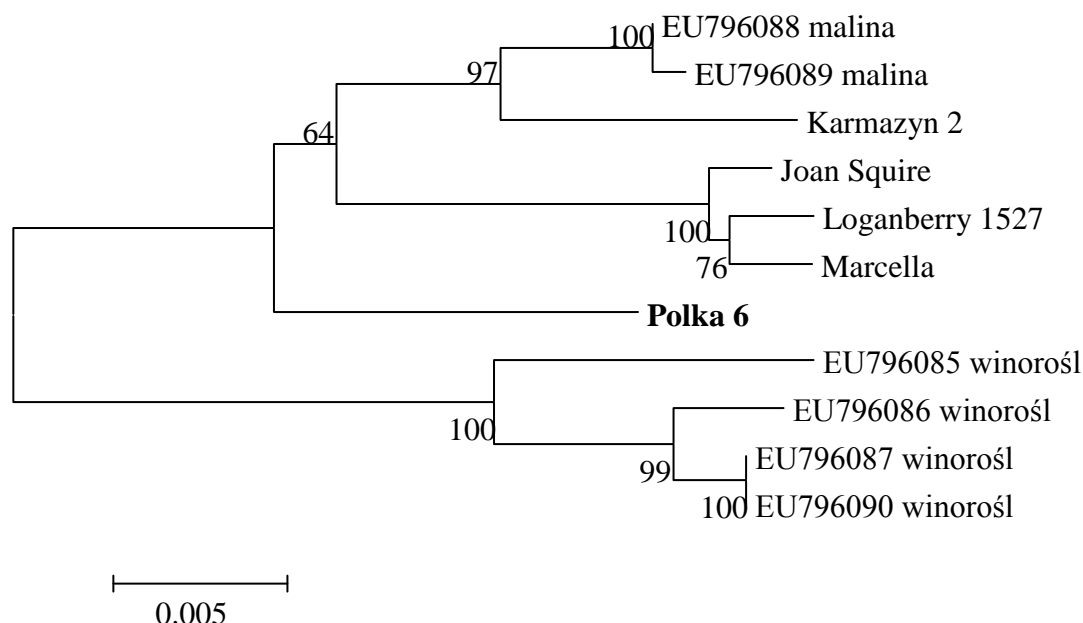
Rys. 9. Zróżnicowane objawy chorobowe na liściach roślin *Chenopodium quinoa* inokulowanych mechanicznie izolatami SMoV Pegat (A) i Markat (B).

Malina (*Rubus idaeus* L.)

Celem badań była analiza sekwencji RNA2 izolatu wirusa krzaczastej karłowatości maliny (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV) wykrytego w roślinie maliny odm. Polka (izolat Polka 6). W obrębie RNA2 znajduje się gen kodujący białko transportowe (*movement protein*, MP) oraz gen białka płaszczka (*coat protein*, CP). RNA2 izolatu Polka 6, po zamplifikowaniu w reakcji RT-PCR ze starterami FM-2/RC-2 (~2200 pz) oraz po oczyszczeniu z żelu, zsekwencjonowano (Genomed, Warszawa). Odczytaną sekwencję RNA2 badanego izolatu RBDV zawierającą kompletne sekwencje genów białka płaszczka (CP) i białka transportowego (MP) analizowano przy pomocy programu Lasergene (DNASTAR, USA). Porównanie badanej

sekwencji z analogicznymi sekwencjami innych izolatów RBDV wykrytych w roślinach z rodzaju *Rubus* wykazało ich wysokie podobieństwo (97,7-99,8%).

Analiza filogenetyczna potwierdziła, że izolat Polka 6 jest blisko spokrewniony z innymi izolatami RBDV wykrytymi w roślinach z rodzaju *Rubus* w Polsce oraz w innych krajach. Izolat ten grupował się w tym samej klastrze co inne analizowane izolaty RBDV z roślin *Rubus* sp. (maliny i loganberry), podczas gdy izolaty wirusa z winorośli znajdowały się na odrębnej gałęzi drzewa filogenetycznego (Rys. 10).



Rys. 10. Dendrogram przedstawiający wyniki analizy filogenetycznej RNA2 skonstruowany przy użyciu metody najbliższego sąsiada (ang. neighbor joining) izolatu Polka 6 oraz innych polskich i zagranicznych izolatów RBDV. Szczepy wirusa z podanymi numerami dostępu pochodzą z bazy danych GenBank. Sekwencje analizowano przy użyciu programów Mega 5.2. Przyrównanie sekwencji wykonano przy użyciu programu ClustalW.

Pędy wybranych roślin maliny odm. 'Polka' i 'Polana', przeznaczonych do ukorzenia *in vitro*, testowano na obecność *Phytophthora* spp. Wyizolowano z nich DNA i przeprowadzono reakcję PCR ze starterami rodzajowo-specyficznymi dla rodzaju *Phytophthora*. W żadnej z testowanych prób nie wykryto obecności patogena.

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

Wykonano 4 testy RT-PCR dwóch roślin jagody kamczackiej odmiany 'Zojka' i 'Wojtek' na obecność wirusa CaMV. W żadnym z przeprowadzonych testów nie stwierdzono obecności wykrywanych wirusów w badanych roślinach.

Czosnek (*Alium sativum* L.)

Wykonano 54 testy na obecność 4 wirusów: SLV, LYSV, GCLV, OYDV w ukorzeniach roślinach czosnku dwóch odmian: 'Jarus' i 'Ornak'. W żadnym z przeprowadzonych testów nie stwierdzono obecności wykrywanych wirusów w badanych roślinach.

VI. Wykrywanie i eliminacja zanieczyszczeń mikrobiologicznych w trakcie ukorzenia metodą *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamczackiej, czosnku

Truskawka (*Fragaria* × *ananasa* Duch.)

Badano udział zanieczyszczeń mikrobiologicznych na etapie ukorzenia dwóch odmian truskawki. W celu wykrywania bakterii w kulturach truskawki fragmenty dolnych części pędów wykładano na pożywkę mikrobiologiczną Nutrient Agar (NA). Testowano po 104 eksplantaty odmiany 'Selva' (3 klony) i 'Grandarosa' (3 klony). Po 2 tygodniach inkubacji w 25°C obserwowano wzrost bakterii na 2 eksplantatach odmiany 'Selva' i 10 eksplantatach odmiany 'Grandarosa'. Pędy, w których oznaczono obecność endogennych bakterii usunięto z kultur. W związku z niskim odsetkiem zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach truskawki na etapie ukorzenia pędów nie istniała potrzeba doboru biocydów w celu ich eliminacji.

Malina (*Rubus idaeus* L.)

Z kultur maliny na etapie ukorzenia izolowano zanieczyszczenia bakteryjne. Zostały one poddane ocenie wrażliwości na biocydy w testach antybiogramowych. Cechy morfologiczne kolonii, reakcja na antybiotyki w testach a także wyniki sekwencjonowania wykazały obecność tych samych bakterii, które występowały w kulturach w czasie namnażania i oznaczono je jako *Pseudomonas*.

Celem doświadczeń była ocena wpływu rodzaju i stężenia biocydu (PPM 2 i 4%, ryfampicyna 50, 100 i 150 mg·L⁻¹, HgCl₂ 0.1 i 0.05% oraz podchloryn sodu 0.1 i 0.05%), sposobu aplikacji (w normalnym ciśnieniu atmosferycznym i w podciśnieniu) i czasu infiltracji na eliminację bakterii z tkanek roślinnych maliny.

W każdej kombinacji było 10 wierzchołków pędów o wysokości 1-1,5 cm z usuniętymi rozwiniętymi liśćmi. W czasie ich wycinania pozostawały w wodzie. Następnie, umieszczano je w roztworach biocydów (kontrola-woda) i wstawiano do eksykatora podłączonego do pompy próżniowej. Pędy utrzymywane w normalnym ciśnieniu pozostawiano na 20 min. Po odkażaniu, wylewano czynnik sterylizujący a pędy płukano w dużej objętości wody sterylnej, następnie osuszano na sterylnej bibule i wykładano na pożywkę. Po 2 dniach odcinano dolne odcinki pędów i umieszczano je na pożywce bakteryjnej NA. Po 2-5 dniach oceniano obecność bakterii. W doświadczeniach, gdzie odkażanie było skuteczne, obserwacje obecności bakterii wykonywano co 4-6 tygodni, w czasie przenoszenia na świeże pożywki.

Wykazano, że odkażanie w podciśnieniu 300 mb jest bardzo skuteczne dla uwalniania pędów maliny z kultur *in vitro* od bakterii towarzyszących, pod warunkiem zastosowania chlorku rtęci w stężeniu 0,1 lub 0,05%. W/w metody nie można stosować dla inicjacji kultur, ponieważ pędy, szczególnie pobrane z warunków polowych mają duże ilości związków fenolowych, które ulegają utlenianiu pod wpływem odkażania i zabijają kultury.

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

Badano udział zanieczyszczeń mikrobiologicznych na etapie ukorzenia dwóch odmian jagody kamczackiej. W celu wykrywania bakterii w kulturach jagody kamczackiej, fragmenty dolnych części pędów wykładano na pożywkę mikrobiologiczną Nutrient Agar (NA) oraz Medium 523 (Rys. 11). Testowano 96 eksplantatów dla odmiany 'Zojka' (48 na pożywce NA i 48 na pożywce 523) oraz 96 eksplantatów dla odmiany 'Wojtek'. W ciągu 2 tygodni inkubacji w 25°C prowadzono obserwacje czy pojawią się kolonie bakterii na podłożu mikrobiologicznym lub mętny „wyciek”, mogący zawierać mikroorganizmy. U obydwu odmian jagody kamczackiej

nie stwierdzono obecności bakterii na żadnym z testowanych podłoży. Kultury jagody kamiczackiej na etapie ukorzenia są wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych (bakterii).



Rys. 11. Testowanie na obecność endogennych bakterii izolowanych podstaw pędów jagody kamiczackiej odmiany 'Zojka' rosnących *in vitro* – pożywka NA (po lewo) i 523 (po prawo)

Czosnek (*Alium sativum* L.)

Bardzo ważnym czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój czosnku *in vitro* są zanieczyszczenia bakteryjne. W oparciu o badania prowadzone w ramach zadania 1.5 Programu Wieloletniego opracowano metodę testowania kultur czosnku na obecność endogennych bakterii oraz oceniono ich wrażliwość na antybiotyki. Fragmenty dolnych części pędów układano się na pożywkę mikrobiologiczną Nutrient Agar (NA). Żółtą bakterię zasiedlającą kultury czosnku zaklasyfikowano do gatunku *Microbacterium testaceum*. Wykazano, że nie jest możliwa eliminacja bakterii zasiedlających tkanki czosnku, ale można ograniczać ich namnażanie przez stosowanie pożywek uzupełnionych biocydami m.in. PPM (Plant Preservative Mixture) i $HgCl_2$, które można podawać w różnym stężeniu, kombinacjach i w różny sposób, m.in. w płynie i w podciśnieniu.

W przypadku aplikacji płynnej najbardziej skuteczny w ograniczaniu zakażeń bakteryjnych kultur czosnku na etapie ukorzenia pędów był PPM oraz rifampicyna w stężeniu $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Biocydy w znaczący sposób ograniczały tworzenie korzeni, a PPM zwiększał udział pędów szklistych. W przypadku aplikacji biocydów w podciśnieniu, najbardziej skuteczną eliminację bakterii z eksplantatów czosnku uzyskano w obecności $HgCl_2$ w stężeniach 0,05 i 0,1%.

VII. Ocena wzrostu i rozwoju roślin truskawki, maliny, jagody kamiczackiej, czosnku oraz ich kondycji fizjologicznej podczas ukorzenia metodą *in vitro*

Proces ukorzenia jest etapem krytycznym w metodzie masowego mnożenia roślin *in vitro*. Dobra kondycja fizjologiczna ukorzenionych mikrosadzonek ma istotny wpływ na późniejszą przeżywalność roślin podczas aklimatyzacji *ex vitro*, co z kolei decyduje o opłacalności produkcji roślin *in vitro*.

Truskawka (*Fragaria × ananasa* Duch.)

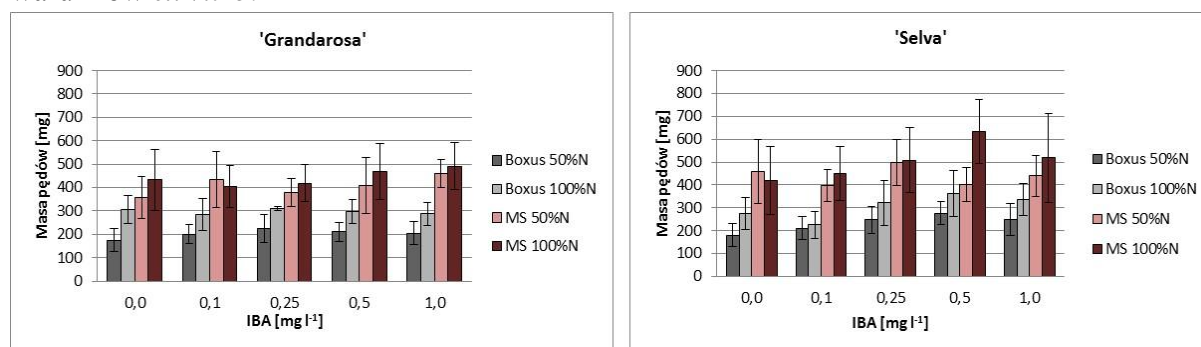
Wpływ pożywki mineralnej, stężenia auksyny i rodzaju węglowodanu na wzrost i rozwój oraz jakość mikrosadzonek truskawki

Celem badań była ocena wzrostu i rozwoju oraz jakości pędów truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' rosnących na pożywkach wg Boxusa (1974) i Murashige i Skooga (MS, 1962) w zależności od stężenia auksyny IBA ($0,1-1,0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) i zawartości azotu (100 i 50%) w pożywce (doświadczenie 1) oraz w zależności od rodzaju cukru (glukoza i sacharoza) i jego zawartości ($10, 20, 30$ i $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) w pożywce (doświadczenie 2). Podczas ukorzenia pędy umieszczone były w temperaturze $23\pm 2^\circ\text{C}$, na świetle białym o natężeniu napromieniowania $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ i 16-godzinnym fotoperiodzie. W każdej kombinacji doświadczalnej było 5 powtórzeń, gdzie

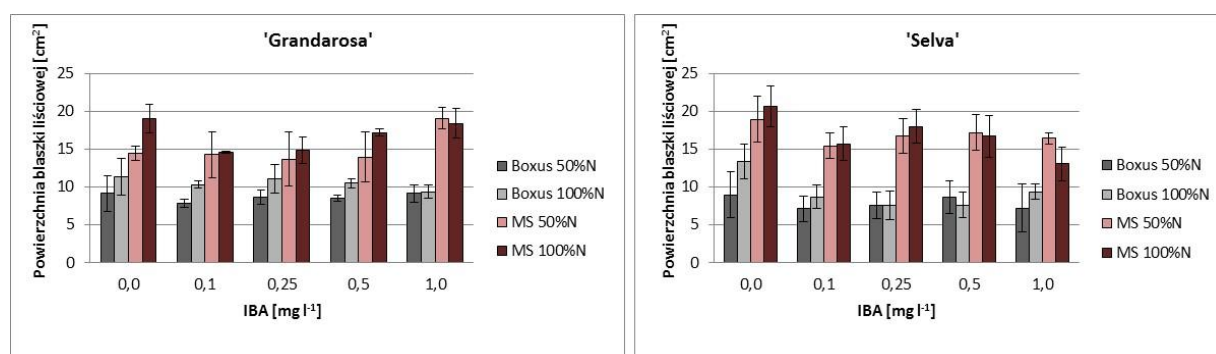
powtórzeniem był słoik z 5 eksplantatami. Po 4 tygodniach wzrostu oznaczone zostały następujące parametry: świeża masa pędów, długość pędów, liczba liści i powierzchnia.

Doświadczenie 1.

U obu odmian, pędy o wyższej masie jednostkowej tworzyły się na pożywce MS niż na pożywce wg Boxusa, a na każdej z pożywek przy 100% niż 50% poziomie soli azotowych. U odmiany 'Selva', istotny wzrost świeżej masy obserwowano na pożywce MS zawierającej 100% soli azotowych i 0,5 mg l⁻¹ IBA (Rys. 12). Więcej liści na pędach obu odmian truskawki tworzyło się podczas ich wzrostu na pożywce MS niż Boxusa. Czynnikiem wpływającym na tworzenie liści była też auksyna. Pędy odmiany 'Grandarosa' cechowały się największą ilością liści podczas ich wzrostu na pożywce MS zawierającej 50% soli azotowych oraz IBA w stężeniu 0,25 mg l⁻¹, natomiast pędy odmiany 'Selva' na pożywce MS zawierającej 100% soli azotowych i 0,5 mg l⁻¹ IBA. U odmiany 'Grandarosa' obserwowano tworzenie wyższych mikrosadzonek niż u odmiany 'Selva'. Najwyższe pędy obu odmian uzyskiwano na pożywce MS o zredukowanym poziomie soli azotowych. Nie stwierdzono znaczącego wpływu auksyny na długość pędów. Podczas ukorzeniania na pożywce MS, pędy obu odmian truskawki cechowały się zdecydowanie większymi blaszkami liściowymi niż na pożywce wg Boxusa (Rys. 13, Rys. 14). Większe blaszki liściowe mogą wpłynąć na bardziej efektywną fotosyntezę i lepszą adaptację do warunków *ex vitro*.



Rys. 12. Wpływ poziomu soli azotowych w różnych pożywkach mineralnych (wg Boxusa oraz Murashige Skooga) i stężenia auksyny (IBA) na świeżą masę pędów truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.



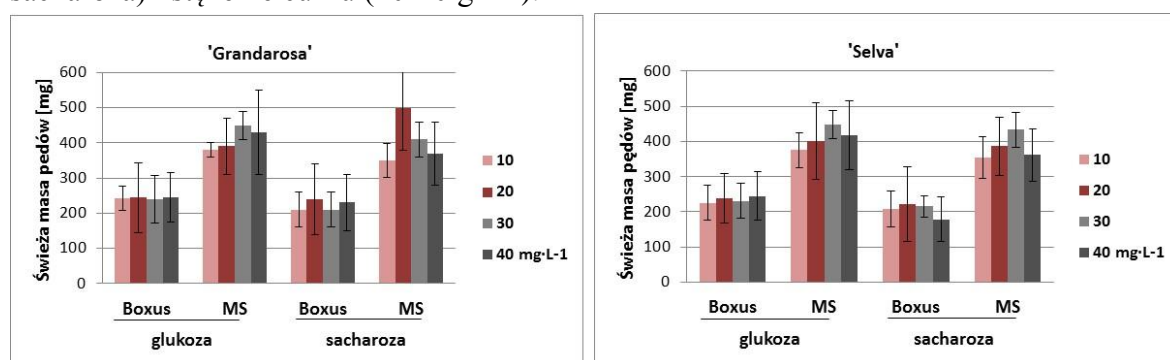
Rys. 13. Wpływ poziomu soli azotowych w różnych pożywkach mineralnych (wg Boxusa oraz Murashige i Skooga) i stężenia auksyny (IBA) na powierzchnię blaszek pędów truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.



Rys. 14. Wpływ poziomu soli azotowych w różnych pożywkach mineralnych (wg Boxusa oraz Murashige i Skooga) wzrost i rozwój pędów truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' podczas ukorzeniania *in vitro*.

Doświadczenie 2

Oceniano wpływ rodzaju cukru (glukoza, sacharoza) i jego zawartości (10, 20, 30, 40 g·L⁻¹) na wzrost i rozwój oraz jakość mikrosadzonki truskawki odm. 'Grandarosa' i 'Selva' podczas ukorzeniania *in vitro*. Niezależnie od rodzaju cukru, pędy obu odmian truskawki posiadały zdecydowanie wyższą świeżą masę pędów podczas ich wzrostu na pożywce MS niż na pożywce wg Boxusa (Rys. 15). Mniejszy wpływ na świeżą masę pędów miał rodzaj cukru (glukoza, sacharoza) i stężenie cukru (10-40 g·L⁻¹).

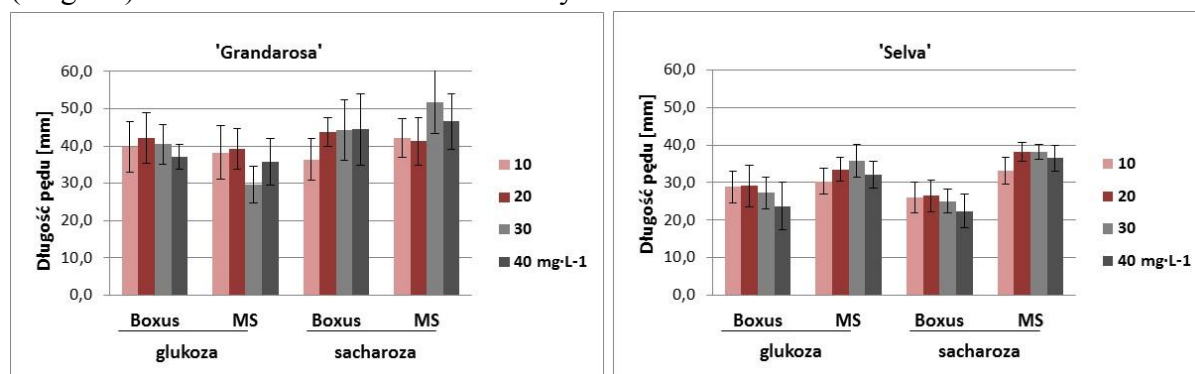


Rys. 15. Wpływ pożywki mineralnej (wg Boxusa oraz Murashige i Skooga) oraz rodzaju cukru i stężenia cukru w obecności 0,1 mg·L⁻¹ IBA na świeżą masę mikrosadzonek truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.

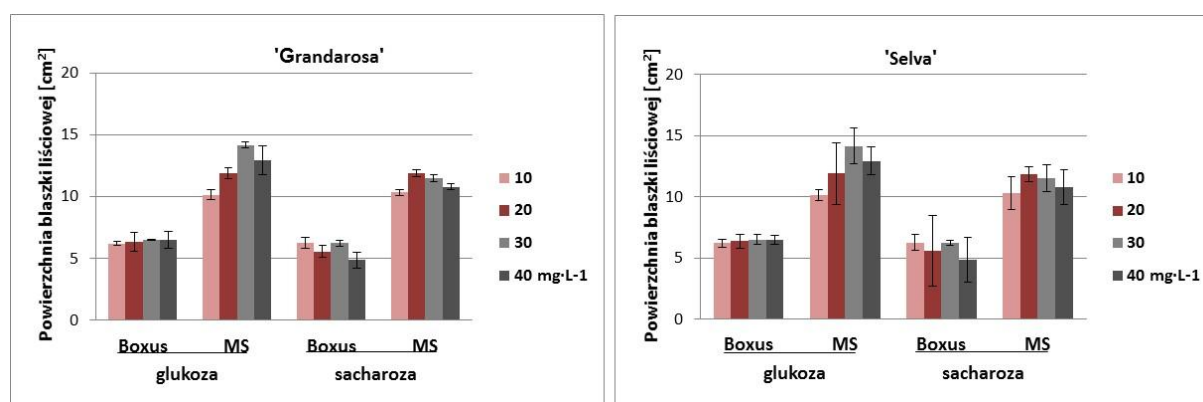
W przypadku odmiany 'Grandarosa', więcej liści na pędach tworzyło się podczas ich wzrostu na pożywce MS niż Boxusa. U odmiany 'Selva' nie obserwowano istotnych różnic w tworzeniu liści w zależności od składu mineralnego pożywki oraz rodzaju i stężenia cukru. Na etapie ukorzeniania *in vitro* wyższe mikrosadzonki uzyskiwano u odmiany 'Grandarosa' (40-50 mm) niż u odmiany 'Selva' (25-38 mm). Stymulacyjny wpływ na wzrost pędów odmiany 'Grandarosa' miała sacharoza (Rys. 16). U odmiany 'Selva' obserwowano tworzenie wyższych mikrosadzonek na pożywce MS niż wg Boxusa, w obecności sacharozy niż glukozy.

Pędy obu odmian truskawki tworzyły zdecydowanie większe blaszki liściowe na pożywce MS niż wg Boxusa. Istotny wpływ na wielkość blaszki liściowej miał również rodzaj cukru i jego stężenie. U obu odmian, pędy rosnące na pożywce MS cechowały się zdecydowanie większymi blaszkami liściowymi w obecności glukozy niż sacharozy. Czynnikiem stymulującym wzrost blaszek liściowych u odm. 'Grandarosa' i 'Selva' było wzrastające stężenie glukozy w pożywce

ukorzeniającej od 10 do 30 g·L⁻¹ było (Rys. 17). Dalszy wzrost stężenia glukozy w pożywce MS (40 g·L⁻¹) hamował wzrost blaszek liściowych.



Rys. 16. Wpływ pożywki mineralnej (wg Boxusa oraz Murashige i Skooga) oraz rodzaju i stężenia cukru w obecności 0,1 mg·L⁻¹ IBA na długość mikrosadzonek truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.



Rys. 17. Wpływ pożywki mineralnej (wg Boxusa oraz Murashige i Skooga) oraz rodzaju i stężenia cukru w obecności 0,1 mg·L⁻¹ IBA na powierzchnię blaszki liściowej truskawki odmiany 'Grandarosa' i 'Selva' *in vitro*.

Wpływ pożywki mineralnej, stężenia auksyny i rodzaju węglowodanu na aktywność fotosyntetyczną pędów truskawki *in vitro*

Fotosynteza jest jednym z ważniejszych procesów zachodzących w roślinach a jednocześnie szczególnie wrażliwym na działanie czynników stresowych. Rośliny rozmnażane *in vitro*, ze względu na obecność cukru w pożywce, niskie stężenie dwutlenku węgla oraz niewłaściwie funkcjonujące aparaty szparkowe charakteryzują się zazwyczaj niską aktywnością fotosyntetyczną, co jest jedną z głównych przyczyn utrudnionej aklimatyzacji mikrosadzonek do warunków szklarniowych i ich dalszego wzrostu. Regulacja składu pożywki w czasie ostatniego etapu rozmnażania roślin *in vitro* (etap ukorzenia) może znacząco poprawić potencjał fotosyntetyczny roślin, a tym samym istotnie wpływać na późniejszą przeżywalność roślin podczas aklimatyzacji *ex vitro*, co z kolei decyduje o opłacalności produkcji roślin *in vitro*.

Celem badań była ocena funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' rosnących na pożywkach wg Boxusa (1974) i Murashige i Skooga (MS, 1962) w zależności od stężenia auksyny IBA (0,0 i 0,1 mg·L⁻¹) i zawartości azotu (100 i 50%) w pożywce (doświadczenie 1) oraz w zależności od rodzaju cukru (glukoza i sacharoza) i jego zawartości (10, 20, 30 i 40 g·L⁻¹) w pożywce (doświadczenie 2). Aktywność fotosyntetyczną mikrosadzonek oceniano na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* za pomocą fluorymetru Mini-PAM (Waltz, Niemcy). Pomiary wykonano po zakończeniu etapu

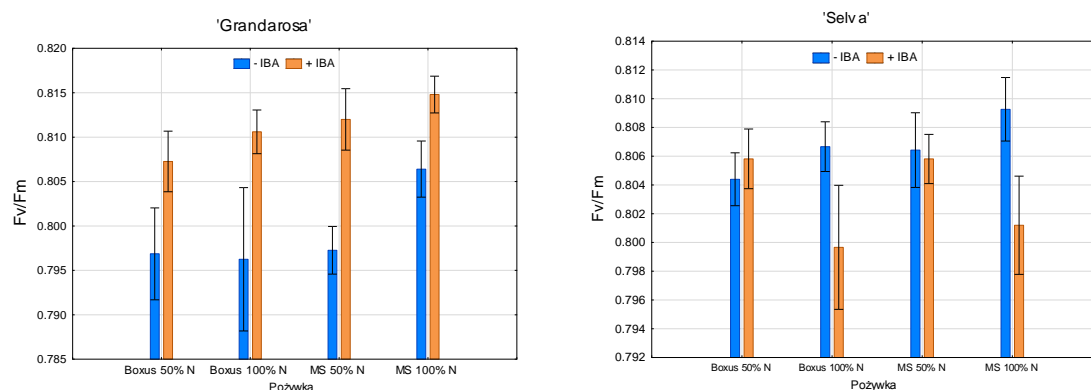
ukorzenia roślin *in vitro*. Wartość fluorescencji zmiennej do maksymalnej (F_v/F_M) roślin zaadaptowanych do ciemności charakteryzuje maksymalną wydajność kwantową PSII, która u większości roślin wyższych w warunkach fizjologicznych przyjmuje wartości od 0,78 do 0,84. Parametr ten wykorzystywany jest jako wiarygodny wskaźnik aktywności fotochemicznej aparatu fotosyntetycznego.

Doświadczenie 1. Ocena funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' rosnących na pożywkach wg Boxusa (1974) i Murashige i Skooga (MS, 1962) w zależności od stężenia auksyny IBA (0,0 i 0,1 mg l⁻¹) i zawartości azotu (100 i 50%) w pożywce. Średnie wartości wyznaczonych parametrów fluorescencji F_v/F_M dla mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' były na zbliżonym poziomie (0,805 dla obu odmian), co wskazuje na podobną zdolność badanych odmian do fotosyntezy i daje podstawy do prognozowania ich podobnej produktywności w warunkach *ex vitro* (Rys. 18). Uzyskane wartości parametrów F_v/F_M powyżej 0,795 dla obu odmian niezależnie od zastosowanych pożywek wskazują, iż mikrosadzonki truskawki w końcowej fazie ukorzenia *in vitro* mają dość dobrze rozwinięty potencjał fotosyntetyczny oraz dobrą sprawność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Nie mniej jednak skład pożywki do ukorzenia w zróżnicowany sposób wpłynął na przebieg reakcji fotosyntezy, co może skutkować łatwością adaptacji mikrosadzonek do warunków *ex vitro*. Wydajność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy mikrosadzonek 'Grandarosa' była nieco wyższa (F_v/F_M 0,79 średnio) na pożywce zawierającej auksynę IBA niż na pożywce bez auksyny (F_v/F_M 0,81 średnio) i nie zależała od rodzaju zastosowanej pożywki (Boxus i MS) oraz zawartości azotu (100% i 50%) w pożywce. Takiej reakcji nie wykazano w przypadku odmiany 'Selva'. Zdolność do konwersji energii świetlnej w fotosystemie II (PS II) przy braku auksyny w pożywce była na podobnym poziomie jak u mikrosadzonek tej odmiany ukorzeniających na pożywce z auksyną. Jednakże równoczesne zastosowanie azotu w pełnej dawce (N 100%) oraz auksyny IBA w stężeniu 0,1 mg L⁻¹ niezależnie od rodzaju pożywki (wg Boxusa i MS) skutkowało obniżeniem zdolności do efektywnej konwersji energii świetlnej w fazie świetlnej fotosyntezy.

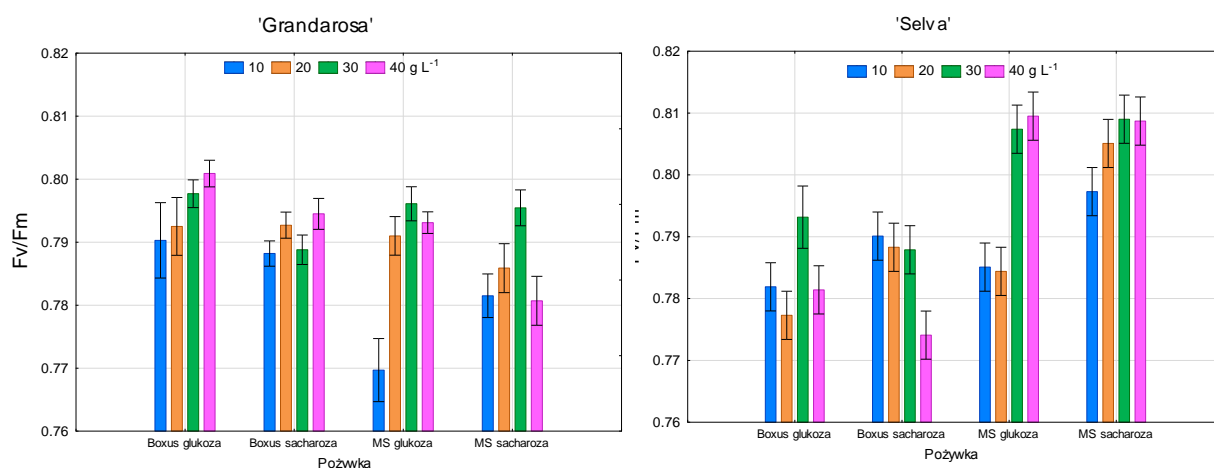
Doświadczenie 2. Ocena funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa' i 'Selva' rosnących na pożywkach Boxus i MS w zależności od rodzaju cukru (glukoza i sacharoza) i jego zawartości (10, 20, 30 i 40 g·L⁻¹) w pożywce.

Rodzaj zastosowanej pożywki oraz zawartość cukru (10 – 40 g·L⁻¹) istotnie wpływały na rozwój potencjału fotosyntetycznego mikrosadzonek truskawki w końcowym etapie ukorzenia *in vitro* (Rys. 19). Obniżanie zawartości cukru w pożywce do ukorzenia mikrosadzonek *in vitro* stosowany jest dla niektórych gatunków roślin w celu stymulacji rozwoju aparatu fotosyntetycznego. W przypadku truskawki, niska zawartość cukru w pożywce (10 g·L⁻¹) na ogół negatywnie wpływała na efektywność reakcji fotochemicznej w PSII, o czym świadczą niskie wartości parametru F_v/F_M uzyskane dla obu badanych odmian. Najwyższą aktywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy wykazywały mikrosadzonki truskawki 'Grandarosa' ukorzeniające na pożywce wg Boxusa zawierające glukozę w stężeniu 40 g·L⁻¹, co wiązało się z wysoką wartością parametru F_v/F_M (0,80). Rozwój aparatu fotosyntetycznego mikrosadzonek truskawki 'Selva' był znacznie lepszy na pożywce MS w porównaniu z pożywką wg Boxusa. Najwyższe uzyskane wartości indukcji fluorescencji chlorofilu (F_v/F_M) w liściach mikrosadzonek odmiany 'Selva'

ukorzenianych na pożywce MS wzbogaconej w glukozę lub sacharozę w ilości 30–40 g·L⁻¹ świadczą o ich wysokiej potencjalnej aktywności fotosyntetycznej.



Rys. 18. Potencjalna efektywność reakcji fotochemicznej w PSII (parametr F_v/F_M) mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa i 'Selva' ukorzenianych na pożywkach wg Boxusa i Murashige i Skooga (MS) w zależności od stężenia auksyny IBA (0,0 i 0,1 mg·L⁻¹) oraz zawartości azotu (100 i 50%) w pożywce.



Rys. 19. Potencjalna efektywność reakcji fotochemicznej w PSII (parametr F_v/F_M) mikrosadzonek truskawki 'Grandarosa i 'Selva' ukorzenianych na pożywkach wg Boxusa (B) i Murashige i Skooga (MS) w zależności od rodzaju cukru (glukozą i sacharozą) i jego zawartości (10, 20, 30 i 40 g·L⁻¹) w pożywce.

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

Doświadczenie 1. Badano wpływ auksyn (IBA, IAA) na wzrost, rozwój oraz kondycję fizjologiczną roślin jagody kaczackiej podczas fazy ukorzeniania w temperaturze 23°C. Po 5 tygodniach wzrostu oceniono długość pędu, liczbę liści, świeżą masę pędu oraz zawartość chlorofilu w liściach. Zawartość chlorofilu oznaczano spektrofotometrycznie wg metody Bruinsma (1963). Obserwacje i analizy wykonano dla pędów rosnących na następujących pożywkach:

1. Kontrola (pożywka MS bez auksyn)
2. IBA 0,1 mg·L⁻¹
3. IBA 1,0 mg·L⁻¹
4. IBA 2,5 mg·L⁻¹
5. IBA 4,0 mg·L⁻¹
6. IAA 0,1 mg·L⁻¹
7. IAA 1,0 mg·L⁻¹
8. IAA 2,5 mg·L⁻¹
9. IAA 4,0 mg·L⁻¹
10. IBA 0,1 mg·L⁻¹+IAA 0,1 mg·L⁻¹

11. IBA 1,0 mg·L⁻¹+IAA 1,0 mg·L⁻¹

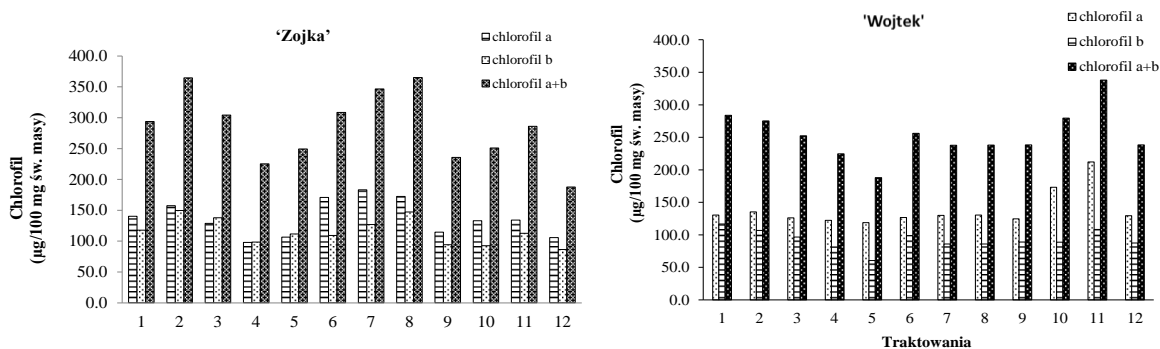
12. IBA 2,5 mg·L⁻¹+IAA 4,0 mg·L⁻¹

Wyniki badań wykazały, że zastosowane auksyny (IBA, IAA) wpływały stymulująco na wzrost pędów w sposób zależny od ich stężenia (Tab. 19). Auksyny zwiększały także świeżą masę pędów jagody kaczackiej. U odmiany ‘Zojka’, najwyższy przyrost świeżej masy w porównaniu z pożywką kontrolną uzyskano w obecności 2,5 mg·L⁻¹ IBA i 4,0 mg·L⁻¹ IAA, a u odmiany ‘Wojtek’ pod wpływem samego IBA (2,5 i 4 mg·L⁻¹) (Tab. 10). Auksyna była też czynnikiem stymulującym tworzenie liści u jagody kaczackiej w warunkach *in vitro*.

Tabela 10. Wpływ auksyn na długość pędu, liczbę liści i świeżą masę pędów jagody kaczackiej 2 odmian ‘Zojka’ i ‘Wojtek’

L.p.	Długość pędu [mm]		Liczba liści/pęd		Świeża masa [mg]	
	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’
1.	40,5	43,6	9,6	9,8	42,8	65,8
2.	43,5	45,6	9,6	9,8	46,1	64,4
3.	54,2	52,6	11,0	10,0	69,7	66,6
4.	60,2	76,6	11,5	11,3	81,7	118,6
5.	61,2	76,5	11,1	11,8	77,7	110,9
6.	46,4	41,6	9,4	9,5	50,7	56,4
7.	57,5	55,2	10,2	11,0	60,4	71,1
8.	57,4	66,0	10,6	11,0	70,6	72,4
9.	68,0	66,2	11,6	12,1	82,9	79,4
10.	54,4	48,2	10,9	10,6	76,6	61,0
11.	64,1	63,1	12,2	10,6	81,9	65,6
12.	77,6	63,8	11,6	10,4	90,8	61,3

Wyniki badań wykazały także, iż wysokie stężenie auksyn, które stymulowało tworzenie korzeni i przyrost świeżej masy liści obniżało zawartość chlorofilu w liściach. U odmiany ‘Zojka’ najniższy poziom chlorofilu stwierdzono w pędach traktowanych IBA (2,5 mg·L⁻¹) i IAA (4 mg·L⁻¹), natomiast u odmiany ‘Wojtek’ pod wpływem IBA w stężeniu 4 mg·L (Rys. 20).



Rys. 20. Wpływ auksyn na zawartość chlorofilu w liściach jagody kaczackiej po 5 tygodniach ukorzeniania *in vitro*

Doświadczenie 2. Badano wpływ cukrów, temperatury i soli azotowych w obecności auksyny na wzrost i rozwój pędów jagody kaczackiej podczas ukorzeniania *in vitro*. Wykonano 12 traktowań dla każdej odmiany. W każdej kombinacji było 5 powtórzeń, powtórzaniem był słoik z 5 eksplantatami.

Sacharoza

13. Sacharoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

14. Sacharoza 30 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

15. Sacharoza 50 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

Glukoza

16. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

17. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

18. Glukoza 10 gL⁻¹+NAA 0,1 mgL⁻¹

Temperatura 15°C±1

19. 100% KNO₃, 100% NH₄NO₃+IBA 0,5 mgL⁻¹

20. 50% KNO₃, 50% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

21. 25% KNO₃, 25% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

Temperatura 23°C±1

22. 100% KNO₃, 100% NH₄NO₃+IBA 0,5 mgL⁻¹

23. 50% KNO₃, 50% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

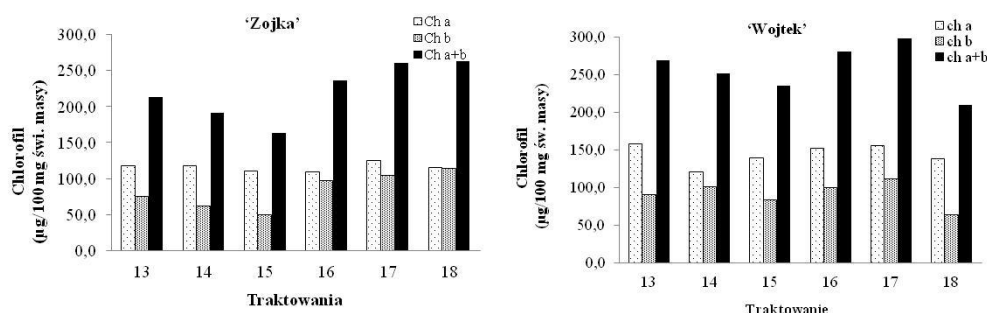
24. 25% KNO₃, 25% NH₄NO₃+ IBA 0,5 mgL⁻¹

Wyniki badań wykazały, że rodzaj i stężenie cukru w pożywce wpływały na długość pędu oraz liczbę liści/pęd jagody kaczackiej. U odmiany ‘Zojka’ obserwowano tworzenie wyższych pędów na pożywce z sacharozą (47,8 mm) niż glukozą (35,1 mm), w przypadku ich aplikacji w stężeniu 10 gL⁻¹. U obu odmian, najwięcej liści na pędzie zanotowano na pożywce zawierającej sacharozę w stężeniu 30 gL⁻¹, odpowiednio 11,7 liści/pęd u odm. ‘Zojka’ i 11,0 liści/pęd u odm. ‘Wojtek’ (Tab. 11). Wykazano, że pędy obu odmian jagody kaczackiej rosnące w temperaturze 15°C były niskie, z liczbą liści w przedziale od 8,0 do 10,4. Świeża masa tych pędów była również niższa w porównaniu do pędów rosnących w temperaturze 23°C. Obniżenie soli azotowych w pożywce MS (50% i 25%) u odmiany ‘Zojka’ (w 15°C) hamowało rozwój pędów i obniżało świeżą masę pędów (Tab. 11).

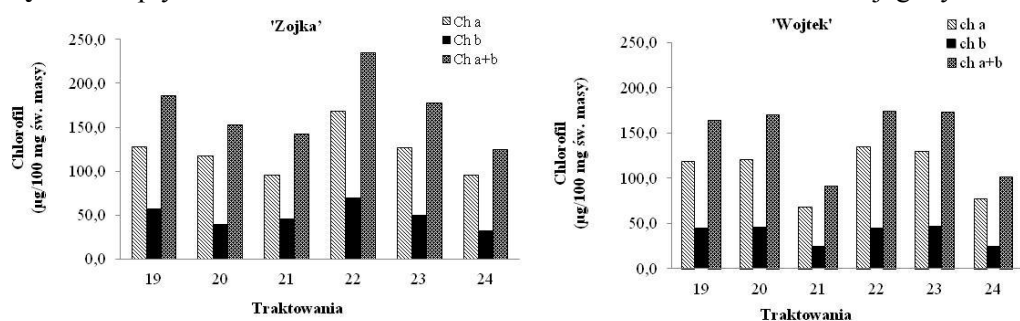
Tabela 11. Wpływ cukru, soli azotowych i temperatury na długość pędu, liczbę liści i świeżą masę pędów jagody kaczackiej odmiany ‘Zojka’ i ‘Wojtek’

L.p.	Długość pędu [mm]		Liczba liści/pęd		Świeża masa [mg]	
	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’	‘Zojka’	‘Wojtek’
SACHAROZA						
13.	47,8	45,8	10,2	11,7	50,8	39,6
14.	58,2	44,0	11,7	11,0	66,2	41,6
15.	37,4	29,5	8,4	8,2	58,0	37,8
GLUKOZA						
16.	35,1	32,6	10,4	9,5	46,8	35,7
17.	43,8	40,8	10,4	9,8	65,8	38,8
18.	31,0	29,4	7,7	7,4	49,1	43,6
Temperatura 15°C±1						
19.	46,4	35,5	10,4	8,0	50,4	36,9
20.	39,2	34,6	9,0	8,1	36,0	32,5
21.	39,2	33,1	9,7	8,1	30,4	32,2
Temperatura 23°C±1						
22.	43,6	54,6	8,6	9,5	47,6	62,6
23.	50,5	50,9	9,1	8,5	56,8	51,9
24.	49,6	36,6	8,0	8,1	57,2	45,4

Stwierdzono, że wysoki poziom cukru w pożywce w stężeniu 50 gL⁻¹ (sacharoza u odm. ‘Zojka’ i glukoza u odm. ‘Wojtek’) obniża zawartość chlorofilu w liściach jagody kaczackiej (Rys. 21). Również zmniejszenie soli azotowych do 25% znacznie obniżało zawartość chlorofilu w liściach u obu odmian (Rys. 22).



Rys. 21. Wpływ cukrów na zawartość chlorofilu w liściach dwóch odmian jagody kaczackiej



Rys. 22. Wpływ temperatury i soli azotowych na zawartość chlorofilu w liściach dwóch odmian jagody kaczackiej

Czosnek (*Alium sativum* L.)

Podczas ukorzenia (cebulowania) *in vitro* przeprowadzono ocenę wzrostu i rozwoju czosnku. Określano wpływ cytokinin: kinetyny, NAA, BAP oraz TDZ na ten proces. U odmiany 'Jarus' stwierdzono pozytywny wpływ 1 mg l⁻¹ BAP na liczbę liści (2,9/eksplantat) wytworzonych na etapie cebulowania *in vitro*. U odmiany 'Ornak', stymulujący wpływ na tworzenie liści (4,7/eksplantat) miał tidiazuron (1,0 mg·L⁻¹) podany łącznie z NAA. W obecności TDZ (0,1 mg L⁻¹) i NAA uzyskano najdłuższe pędy (29,7 cm) u odmiany 'Ornak'. W przypadku odmiany 'Jarus', stymulujący wpływ na wzrost pędów miała kinetyka podana łącznie z NAA (Tab. 25).

Tabela 12. Wpływ regulatorów wzrostu w pożywce B5 na wzrost i rozwój pędów czosnku odmiany 'Ornak' i 'Jarus' na etapie ukorzenia *in vitro*

Regulatory wzrostu [mg·L ⁻¹]	'Ornak'		'Jarus'	
	Liczba liści	Długość [cm]	Liczba liści	Długość [cm]
10 Kin; 0,1 NAA	4,2	20,0	2,2	10,4
1 BAP; +PPM	3,5	11,8	2,9	13,1
1TDZ; 1NAA; +PPM	4,7	16,0	2,0	5,5
0,1 TDZ; 0,1 NAA; +PPM	3,7	29,7	2,1	9,5
10 Kin; 0,1 NAA; +PPM	3,0	12,0	2,2	16,1

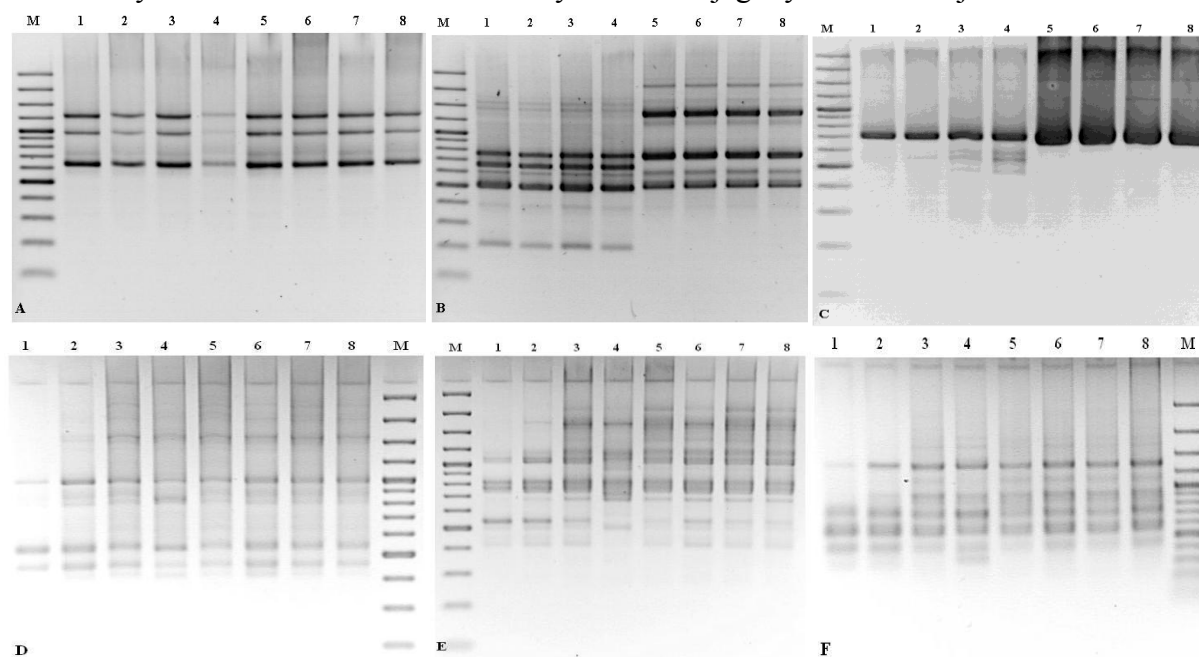
VII. Ocena tożsamości genetycznej roślin truskawki, maliny, jagody kaczackiej, czosnku podczas ukorzenia metodą *in vitro*

1 etap: Ocena tożsamości genetycznej jagody kaczackiej z wykorzystaniem markerów ISSR

Materiał do badań stanowiły dwie odmiany jagody kaczackiej 'Wojtek' oraz 'Zojka'. Ponowna ocena tożsamości genetycznej badanych odmian została wykonana przy użyciu 14 markerów ISSR (810, 827, 865, 822, 823, 825, 828, 830, 834, 840, 843, 846, 853, 855), które w badaniach przeprowadzonych w latach 2015-2016 generowały produkty PCR. Przebadane zostały zarówno rośliny donorowe, z których pobierane były pąki do założenia kultur *in vitro*

(matecznik szklarniowy), jak i rośliny z matecznika w kulturach *in vitro*. Pobrany materiał roślinny został utarty w ciekłym azocie, a następnie przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) został wyizolowany genomowy DNA w ilości 2 powtórzeń dla każdej badanej próby. Następnie przy użyciu spektrofotometru Epoch (BioTek) przeprowadzono ocenę ilościową i jakościową prób DNA. Tak przygotowane preparaty genomowego DNA stanowiły matrycę do przeprowadzenia reakcji PCR z użyciem starterów ISSR. Reakcje PCR z wykorzystaniem starterów ISSR przeprowadzone zostały w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 20 ng matrycy DNA; 1X Dream Taq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific); 0,65µl dNTPs (10mM) (Promega); 0,45µl startera (10µM); 0,5U Dream Taq Green Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Reakcja prowadzono w termocyklerze C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) według profilu termicznego: denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 5 minut; następnie 45 cykli reakcyjnych (94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 55°C przez 40 sekund, wydłużanie 72°C przez 90 sekund), końcowe wydłużanie w temp. 72°C przez 7 minut oraz końcowe schładzanie prób do 10°C. Produkty amplifikacji PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z barwnikiem Simply Safe™ (EURx) w buforze 0,5x TBE przy napięciu 60V przez 1,5 godziny w aparacie Multi Sub™ Screen (Clever Scientific Ltd.). Rozdziały elektroforetyczne uwidaczniane zostały w świetle UV i fotografowane przy pomocy kamery Syngen Biotech. Długość produktów ISSR-PCR oceniano według 0,5µg wzorca GeneRuler™100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Podczas analizy elektroforegramów oceniano liczbę prążków (produktów ISSR) oraz ich wielkość.

Spośród 14 testowanych starterów ISSR, wszystkie generowały produkty amplifikacji w reakcji PCR, a 4 z nich różnicowały badane odmiany. Na podstawie analiz elektroforegramów potwierdzono tożsamość genetyczną odmian zaproponowanych do badań. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 13, natomiast poniższe zdjęcia przedstawiają przykładowe rozdziały elektroforetyczne markerów ISSR dla badanych odmian jagody kamiczackiej.



Rys. 23. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji DNA badanych roślin matecznych jagody kamiczackiej ('Wojtek' – 1,2,3,4 i 'Zojka' – 5,6,7,8) wykonanych techniką ISSR-PCR przy zastosowaniu startera A – 810, B – 825, C- 865, D – 822, E – 823, F - 843. Wzorzec masowy (M) – 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Tabela 13. Analiza markerów ISSR w roślinach matecznych jagody kaczackiej.

gatunek	numer startera ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]
			ogółem	polimorficzne	
jagoda kaczacka	810	1500 – 500	6	1	16,7
	822	2000 – 400	9	0	0
	823	2000 – 400	13	0	0
	825	2000 – 200	11	2	18,2
	827	2500 – 550	12	1	8,3
	828	1200 – 1000	2	0	0
	830	1700	1	0	0
	834	900 – 400	3	0	0
	840	1500 – 1000	2	0	0
	843	1500 – 300	9	0	0
	846	1700 – 800	3	0	0
	853	2000 – 500	6	0	0
	855	1500 – 500	4	0	0
865	1500 – 500	6	3	50,0	

2 etap: Analiza markerów ISSR dla jagody kaczackiej oraz czosnku

Materiał badawczy stanowiły 2 odmiany jagody kaczackiej ‘Wojtek’ i ‘Zojka’ na etapie ukorzeniania pędów *in vitro* na pożywce MS o zróżnicowanym poziomie auksyn (IBA, IAA lub/i NAA), cukru i azotu oraz rosnących w różnych temperaturach. Kontrolę stanowiła pożywka MS (100% N, sacharoza 30 gL⁻¹). Do analiz zmienności genetycznej czosnku na etapie ukorzeniania, pobrano materiał roślinny odm. ‘Ornak’, który był traktowany rybawiryną oraz po termoterapii w celu uwolnienia od wirusów. Materiał roślinny został utarty w ciekłym azocie, a następnie przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) izolowano genomowy DNA, dla którego przeprowadzono ocenę ilościową i jakościową prób (Tab. 14). Tak przygotowane preparaty genomowego DNA stanowiły matrycę do przeprowadzenia reakcji PCR z użyciem starterów ISSR. Do analiz zostały wytypowane konkretne zestawy markerów – dla jagody – 4 startery (825, 810, 827, 865), dla czosnku – 5 starterów (822, 823, 825, 853, 855). Reakcje PCR z wykorzystaniem starterów ISSR przeprowadzone zostały w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 20 ng matrycy DNA; 1X DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific); 0,65 µl dNTPs (10 mM) (Promega); 0,45µl startera (10 µM); 0,5U DreamTaq Green Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Reakcje prowadzono w termocyklerze C1000 ThermalCycler (Bio-Rad) według profilu termicznego: denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 5 minut; następnie 45 cykli reakcyjnych (94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 55°C przez 40 sekund, wydłużanie 72°C przez 90 sekund), końcowe wydłużanie w temp. 72°C przez 7 minut oraz końcowe schładzanie prób do 10°C. Produkty amplifikacji PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z barwnikiem Simply SafeTM (EURx) w buforze 0,5x TBE przy napięciu 60V przez 1,5 godziny w aparacie Multi SubTM Screen (Clever Scientific Ltd.). Rozdziały elektroforetyczne uwidacziano w świetle UV i fotografowano przy pomocy kamery Syngen Biotech. Długość produktów ISSR-PCR oceniano według 0,5 µg wzorca GeneRulerTM100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Podczas analizy elektroforegramów oceniano liczbę prążków (produktów ISSR), ich wielkość oraz zróżnicowanie pomiędzy badanymi próbami.

Jagoda kaczacka

Przy użyciu analiz markerów ISSR wykazano, iż dodanie IBA w stężeniu 0,1 i 4,0 mgL⁻¹ do pożywki MS zawierającej 100% soli azotowych indukuje w pędach odmiany ‘Wojtek’ zmienność na poziomie 12,5% (Tab. 15). W przypadku ukorzeniania pędów odm. ‘Wojtek’ na

pożywcę MS o zredukowanym poziomie soli azotowych i IBA w stężeniu $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, wyższą zmienność obserwowano podczas wzrostu roślin w 23°C (20,8%) niż 15°C (12,5%). U roślin odmiany 'Zojka' zaobserwowano zjawisko zmienności w kulturach *in vitro* podczas wzrostu na pożywkach zawierających różne stężenia IAA lub IBA+IAA na średnim poziomie 16,7% (Tab. 15).

Tabela 14. Wyniki pomiaru spektrofotometrycznego preparatów DNA izolowanych z roślin jagody kamiczackiej (podano średnią z dwóch powtórzeń).

odmiana	nazwa próbki	oznaczenie	ng/ul	$^{260}/_{280}$
'Wojtek'	M1 – IBA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	M1	18,383	1,786
	M4 – IBA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	M4	20,332	1,493
	M5 – IAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	M5	21,817	1,717
	M8 – IAA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	M8	13,110	1,745
	M9 – IBA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	M9	14,332	1,797
	M10 – IBA $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $1,0 \text{ mg L}^{-1}$	M10	20,833	1,844
	M11 – IBA $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	M11	25,573	1,730
	M20 – sacharoza 30 g L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	M20	29,644	1,829
	M23 – glukoza 30 g L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	M23	28,556	1,844
	M15 – 50% KNO_3 , NH_4NO_3 + IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 15°C	M15	31,484	1,873
	M16 – 50% KNO_3 , NH_4NO_3 + IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 23°C	M16	45,268	1,751
	M0 – 100% N, sacharoza 30 g L^{-1}	M0	21,787	1,831
'Zojka'	S1 – IBA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	S1	18,182	1,726
	S4 – IBA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	S4	14,226	1,757
	S5 – IAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	S5	16,541	1,720
	S8 – IAA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	S8	42,377	1,728
	S9 – IBA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	S9	26,348	1,728
	S10 – IBA $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $1,0 \text{ mg L}^{-1}$	S10	29,732	1,749
	S11 – IBA $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ + IAA $4,0 \text{ mg L}^{-1}$	S11	18,184	1,753
	S20 – sacharoza 30 g L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	S20	35,615	1,753
	S23 – glukoza 30 g L^{-1} + NAA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$	S23	43,730	1,857
	S15 – 50% KNO_3 , NH_4NO_3 + IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 15°C	S15	38,751	1,752
	S16 – 50% KNO_3 , NH_4NO_3 + IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 23°C	S16	53,029	1,768
	S0 – 100% N, sacharoza 30 g L^{-1}	S0	18,919	1,749

Tabela 15. Analiza markerów ISSR dwóch odmian jagody kamiczackiej podczas ukorzeniania w warunkach *in vitro* ('-' – brak produktów PCR).

odmiana	nr pożywki	starter ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
				ogółem	polimorficzne		
'Wojtek'	M1	825	500 – 1000	3	0	0	12,5
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	300 – 700	2	1	50,0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M4	825	500 – 1000	3	0	0	12,5
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	300 – 700	2	1	50,0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M5	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	700	1	0	0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M8	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	700	1	0	0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M9	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	700	1	0	0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M10	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	700	1	0	0	
		865	300 – 1400	6	0	0	

	M11	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	700	1	0	0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
	M20	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	3	0	0	
		827	300 – 700	2	0	0	
		865	300 – 1400	7	0	0	
	M23	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	300 – 700	3	0	0	
		865	300 – 1400	7	0	0	
	M15	825	500 – 1000	4	1	25,0	12,5
		810	600 – 1300	4	0	0	
		827	500 – 700	4	1	25,0	
		865	300 – 1400	6	0	0	
M16	825	500 – 1000	3	1	33,3	20,8	
	810	600 – 1300	4	0	0		
	827	500 – 700	4	2	50,0		
	865	300 – 1400	6	0	0		
'Zojka'	S1	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 700	3	0	0	
	S4	825	500 – 1000	3	0	0	0
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 700	3	0	0	
	S5	825	500 – 1000	3	0	0	16,7
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 2000	6	3	50,0	
	S8	825	500 – 1000	3	0	0	16,7
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 2000	6	3	50,0	
	S9	825	500 – 1000	3	0	0	16,7
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 2000	6	3	50,0	
	S10	825	500 – 1000	3	0	0	16,7
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 2000	6	3	50,0	
	S11	825	500 – 1000	3	0	0	16,7
		810	-	-	-	-	
		827	200 – 700	3	0	0	
		865	300 – 2000	6	3	50,0	
	M20	825	300 – 1000	9	0	0	0
		810	500 – 1000	5	0	0	
		827	200 – 1700	5	0	0	
		865	300 – 1000	6	0	0	
M23	825	300 – 1000	9	0	0	0	
	810	500 – 1000	5	0	0		
	827	200 – 1700	6	0	0		
	865	300 – 1000	4	0	0		
M15	825	300 – 1000	9	0	0	0	
	810	500 – 1000	5	0	0		
	827	200 – 1700	4	0	0		
	865	300 – 1000	6	0	0		
M16	825	300 – 1000	9	0	0	0	
	810	500 – 1000	7	0	0		
	827	200 – 1700	5	0	0		
	865	300 – 1000	6	0	0		

Czosnek

Przeprowadzono analizę markerów ISSR różnicujących mikrosadzonki czosnku odmiany 'Ornak' podczas ukorzenia w warunkach kultur *in vitro*. Do analiz pobrano materiał roślinny traktowany rybawiryną oraz poddany termoterapii razem z odpowiadającymi im próbami kontrolnymi. W sumie zebrano 5 prób materiału roślinnego, z których wyizolowany DNA posłużył jako matryca do analiz tożsamości genetycznej z wykorzystaniem markerów ISSR. Wyniki pomiarów spektrofotometrycznych uzyskanych preparatów DNA przedstawia Tabela 16. Podczas analizy elektroforegramów produktów ISSR oceniano liczbę prążków (produktów ISSR), ich wielkość oraz zróżnicowanie pomiędzy roślinami kontrolnymi, a roślinami poddanymi procesowi odwirusowywania. Analiza z wykorzystaniem markerów ISSR nie wykazała zmienności u badanych mikrosadzonek (Tab. 17).

Tabela 16. Wyniki pomiaru spektrofotometrycznego preparatów DNA izolowanych z roślin czosnku (podano średnią z dwóch powtórzeń).

gatunek	odmiana	rodzaj traktowania (oznaczenie próby)	oznaczenie	ng/ul	²⁶⁰ / ₂₈₀
czosnek	'Ornak'	termoterapia (O-T)	O-T	40,166	1,815
		kontrola po termoterapii (O-KT)	O-KT	65,567	1,824
		rybawiryna (O-R)	O-R	28,258	1,726
		kontrola po rybawirynie (O-KR)	O-KR	43,012	1,757
		kontrola (O-K)	O-K	41,369	1,659

Tabela 17. Analiza markerów ISSR czosnku odmiany 'Ornak' podczas ukorzenia w warunkach *in vitro*.

odmiana	rośliny	starter ISSR	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
				ogółem	polimorficzne		
'Ornak'	poddane termoterapii	822	2000 – 1000	7	0	0	
		823	1200 – 400	8	0		
		825	1350 – 500	6	0		
		853	2000 – 500	10	0		
		855	1500 – 500	11	0		
	traktowane rybawiryną	822	600 – 1300	7	0	0	
		823	300 – 700	8	0		
		825	300 – 1400	6	0		
		853	500 – 1000	11	0		
		855	600 – 1300	10	0		

3 etap: Analiza markerów AFLP dla truskawki, maliny, czosnku oraz jagody kamiczackiej

W roku 2017 przeprowadzono analizę markerów AFLP różnicujących odmiany truskawki, maliny, jagody kamiczackiej oraz czosnku podczas ukorzenia w warunkach kultur *in vitro*. Do analiz pobrano materiał roślinny dwóch odmian truskawki 'Selva' i 'Grandarosa' rosnących na różnych pożywkach mineralnych (wg Boxusa i MS), o różnym poziomie soli azotowych i auksyny (IBA); dwóch odmian jagody kamiczackiej 'Zojka' i 'Wojtek' rosnących na pożywkach MS o zróżnicowanym poziomie auksyn (IBA, IAA lub/i NAA), cukru i soli azotowych w różnych temperaturach; oraz jednej odmiany czosnku 'Ornak' traktowanej rybawiryną lub po termoterapii w celu odwirusowania (Tab. 18).

Tabela 18. Skład pożywki podczas ukorzenia w kulturach *in vitro* dla badanych odmian jagody kamiczackiej, czosnku oraz truskawki.

gatunek	nr próby	skład pożywki/traktowanie
jagoda kamiczacka ('Zojka'/'Wojtek')	S1/M1	IBA 0,1 mgL ⁻¹
	S4/M4	IBA 4,0 mgL ⁻¹
	S5/M5	IAA 0,1 mgL ⁻¹
	S8/M8	IAA 4,0 mgL ⁻¹
	S9/M9	IBA 0,1 mgL ⁻¹ + IAA 0,1 mgL ⁻¹
	S10/M10	IBA 1,0 mgL ⁻¹ + IAA 1,0 mgL ⁻¹
	S11/M11	IBA 2,5 mgL ⁻¹ + IAA 4,0 mgL ⁻¹
	S20/M20	sacharoza 30 gL ⁻¹ + NAA 0,1 mgL ⁻¹
	S23/M23	glukoza 30 gL ⁻¹ + NAA 0,1 mgL ⁻¹
	S15/M15	50% KNO ₃ , NH ₄ NO ₃ + IBA 0,5 mgL ⁻¹ , 15°C
	S16/M16	50% KNO ₃ , NH ₄ NO ₃ + IBA 0,5 mgL ⁻¹ , 23°C
	S0/ M0 pożywka podstawowa MS (kontrola)	100%N, sacharoza 30 gL ⁻¹
czosnek ('Ornak')	O-T	Termoterapia
	O-KT	Kontrola po termoterapii
	O-R	Rybawiryna
	O-KR	Kontrola po rybawirynie
	O-K	Kontrola
truskawka ('Grandarosa'/'Selva')	1/13 pożywka podstawowa wg Boxusa	100% N + IBA 0,0 mgL ⁻¹
	2/14 wg Boxusa	100% N + IBA 0,1 mgL ⁻¹
	3/15 wg Boxusa	100% N + IBA 1,0 mgL ⁻¹
	4/16 wg Boxusa	50% N + IBA 0,0 mgL ⁻¹
	5/17 wg Boxusa	50% N + IBA 0,1 mgL ⁻¹
	6/18 wg Boxusa	50% N + IBA 1,0 mgL ⁻¹
	7/19 pożywka podstawowa MS	100% N + IBA 0,0 mgL ⁻¹
	8/20 MS	100% N + IBA 0,1 mgL ⁻¹
	9/21 MS	100% N + IBA 1,0 mgL ⁻¹
	10/22 MS	50% N + IBA 0,0 mgL ⁻¹
	11/23 MS	50% N + IBA 0,1 mgL ⁻¹
	12/24 MS	50% N + IBA 1,0 mgL ⁻¹

Analizę AFLP-PCR przeprowadzono wg metodyki opisanej przez Vos i in. (1995) z wykorzystaniem 5 par starterów AFLP dla truskawki (Pst-TC/Mse-AT, Pst-GA/Mse-GA, Pst-CC/Mse-GG, Pst-GC/Mse-GC, Pst-AG/Mse-CG), maliny (Pst-AT/Mse-AT, Pst-AT/Mse-TC, Pst-AC/Mse-AC, Pst-CC/Mse-CC, Pst-CC/Mse-GG) oraz czosnku (Pst-TC/Mse-TC, Pst-AA/Mse-AC, Pst-CC/Mse-CC, Pst-CC/Mse-GG, Pst-TT/Mse-CC) oraz 4 pary starterów AFLP dla jagody kamiczackiej (Pst-CC/Mse-CC, Pst-TT/Mse-CC, Pst-GC/Mse-TA, Pst-CG/Mse-AG). Wyizolowane preparaty DNA (50 ng) trawiono enzymami restrykcyjnymi *MseI* oraz *PstI*, z których pierwszy rozpoznaje sekwencję 5'...T↓TAA...3', a drugi sekwencję 5'...CTGCA↓G...3'. Po termicznej inaktywacji enzymów restrykcyjnych do uzyskanych 'lepkich końców' przyłączano przy pomocy ligazy T4 (Promega) odpowiednie adaptory o znanej sekwencji (*PstI Adapter 1/PstI Adapter 2* oraz *MseI Adapter 1/MseI Adapter 2*), które posłużyły jako miejsce przyłączania starterów we wstępnej reakcji PCR. Reakcje PCR przeprowadzono w dwóch etapach: 1. we wstępnych reakcjach PCR powielano DNA przy użyciu starterów komplementarnych do sekwencji adapterów (*MseI Primer PCR1* oraz *PstI Primer PCR1*);

2. W reakcjach różnicujących amplifikowano fragmenty DNA przy użyciu par starterów komplementarnych do sekwencji adapterów, ale wzbogaconych o dodatkowe 2 nukleotydy na końcach 3' (*Pst-TC*, *Mse-GA* itd.). Reakcję wstępnej amplifikacji przeprowadzono w 40 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 3 μ l matrycy DNA z przyłączonymi adapterami; 1X Taq Polymerase Reaction Buffer (Sigma-Aldrich); 0,8 μ l dNTPs (10 mM) (Promega); 1,2 μ l każdego z pary starterów (10 μ M); 0,75 U Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) według profilu termicznego: denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 4 minuty; następnie 30 cykli reakcyjnych (denaturacja 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 60°C przez 30 sekund, wydłużanie 72°C przez 60 sekund) oraz końcowe wydłużanie w temp. 72°C przez 7 minut. W końcowym etapie próby schładzano do 10°C. Do przeprowadzenia różnicującej amplifikacji użyto par starterów komplementarnych do sekwencji adapterów, ale wzbogaconych o 2 nukleotydy na końcu 3'. Jako matrycę wykorzystano 30-krotnie rozcieńczone produkty wstępnej amplifikacji. Reakcję prowadzono w 20 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 3 μ l matrycy DNA rozcieńczonej 1:30; 1X Taq Polymerase Reaction Buffer (Sigma-Aldrich); 0,4 μ l dNTPs (10 mM) (Promega); 0,5 μ l startera *PstI-NN* (10 μ M) oraz 0,65 μ l startera *MseI-NN* (10 μ M); 0,75U Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) według profilu termicznego: denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 4 minuty; następnie 13 cykli reakcyjnych (denaturacja 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w temp. 65-56°C przez 30 sekund – temp. przyłączania starterów malała w każdym cyklu o 0,7°C, wydłużanie 72°C przez 60 sekund); 26 cykli (denaturacja 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w temp. 56°C przez 30 sekund, wydłużanie 72°C przez 60 sekund) oraz końcowe wydłużanie w temp. 72°C przez 7 minut. W końcowym etapie próby schładzano do 10°C. Produkty różnicujących reakcji PCR rozdzielano w 6% denaturującym żelu poliakrylamidowym w celu jak najlepszego uwidocznienia prążków różnicujących badane rośliny i genotypy. W tym celu mieszaniny reakcyjne po różnicujących reakcjach PCR poddano denaturacji w temp. 94°C przez 5 minut w buforze zawierającym: 98% amid kwasu mrówkowego (formamid), 10mM EDTA (pH 8,0) i 0,1% błękit bromofenolowy. Denaturowane produkty PCR oraz wzorce masowe (10 bp i 50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym zawierającym 7,5 M mocznika. Elektroforezę prowadzono w buforze 0,5x TBE przy napięciu 80 W, natężeniu 200 mA przez 3-4 godziny w aparacie C.B.S. Scientific, Dual Dedicated Height Nucleic Acid Sequencer. Rozdzielone produkty AFLP wybarwiano w roztworze azotanu srebra – żel wytrząsano w ciemności przez ok. 30 minut w 0,1% roztworze azotanu srebra z dodatkiem 0,05% formaldehydu, następnie płukano w roztworze wodnym węglanu sodu (30 g·L⁻¹) w obecności tiosiarczanu sodu (2 mg·L⁻¹) i 0,05% formaldehydu. Reakcję barwienia zatrzymywano przez zanurzenie żelu w 10% roztworze kwasu octowego. Następnie żel suszono, opisywano oraz fotografowano w celu analizy prążków AFLP. Podczas analizy elektroforegramów produktów AFLP oceniano liczbę prążków (produktów AFLP), ich wielkość oraz zróżnicowanie pomiędzy roślinami kontrolnymi, a roślinami rosnącymi na pożywkach o zróżnicowanym składzie. Poniżej przedstawiono wyniki analiz markerów AFLP dla dwóch odmian truskawki (Tab. 19), jagody kamiczackiej (Tab. 20), czosnku (Tab. 21) oraz maliny (Tab. 22).

Przy zastosowaniu markerów AFLP, wyższą zmienność w pędach truskawki na etapie ukorzeniania stwierdzono u odmiany 'Grandarosa' niż 'Selva'. U roślin odmiany 'Selva',

najwyższy stopień zmienności (1,7%) obserwowano podczas ukorzenia na pożywce MS zawierającej 50% soli azotowych, bez dodatku IBA, natomiast najniższy (0,8%) u roślin ukorzenianych na pożywce MS zawierającej 100% soli azotu i 1,0 mgL⁻¹ IBA. Podczas ukorzenia pędów odm. 'Selva' na pożywce wg Boxusa, niewielką zmienność genetyczną obserwowano jedynie przy zredukowanym do 50% poziomie soli azotowych i obecności 0,1 mgL⁻¹ IBA. U roślin odm. 'Grandarosa' najwyższy stopień zmienności obserwowano u pędów ukorzenianych na pożywce wg Boxusa zawierającej 50% i 1,0 mgL⁻¹ IBA (5,7%) (Tab. 19).

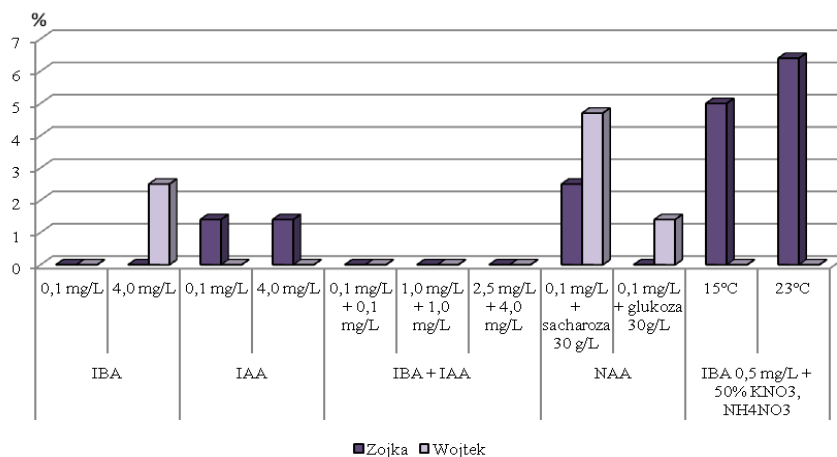
Przy zastosowaniu markerów AFLP, wyższą zmienność w pędach jagody kaczackiej na etapie ukorzenia stwierdzono u odmiany 'Zojka' niż 'Wojtek'. U odm. 'Zojka', najwyższy poziom zmienności (6,4 i 5%) obserwowano na pożywce MS zawierającej 50% soli azotowych i 0,5 mgL⁻¹ IBA, odpowiednio w temp. 15°C i 23°C (Rys. 24). Najwyższy poziom zmienności (4,7%) u roślin odmiany 'Wojtek' obserwowano podczas ukorzenia na pożywce zawierającej NAA (0,1 mgL⁻¹) (Tab. 20).

U mikrosadzonek czosnku odmiany 'Ornak' analiza markerów AFLP wykazała zmienność na poziomie 2,8% u roślin poddanych termoterapii oraz 4% u roślin traktowanych rybawiryną w porównaniu z kontrolą nietraktowaną (Tab. 21).

Tabela 19. Analiza markerów AFLP dla truskawki podczas ukorzenia w warunkach kultur *in vitro*.

odmiana	nr pożywki	pary starterów AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
				ogółem	polimorficzne		
'Selva'	13	Pst-TC/Mse-AT	500-300	24	3	12,5	5,0
		Pst-GA/Mse-GA	700-200	30	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	700-70	24	3	12,5	
		Pst-GC/Mse-GC	800-200	32	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	42	0	0	
	14	Pst-TC/Mse-AT	500-300	24	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	700-200	29	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	700-70	26	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-200	29	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	40	0	0	
	15	Pst-TC/Mse-AT	500-300	23	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	700-200	29	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	700-70	25	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-200	24	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	36	0	0	
	16	Pst-TC/Mse-AT	500-300	27	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	700-200	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	700-70	24	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-200	23	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	38	0	0	
	17	Pst-TC/Mse-AT	500-300	24	1	4,2	0,8
		Pst-GA/Mse-GA	700-200	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	700-70	23	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-200	23	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	37	0	0	
	18	Pst-TC/Mse-AT	500-300	24	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	23	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-50	23	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	37	0	0	
	20	Pst-TC/Mse-AT	500-350	23	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0	
Pst-CC/Mse-GG		800-70	25	0	0		
Pst-GC/Mse-GC		800-50	23	0	0		
Pst-AG/Mse-CG		650-100	35	0	0		
21	Pst-TC/Mse-AT	500-350	24	1	4,2	0,8	
	Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0		
	Pst-CC/Mse-GG	800-70	25	0	0		
	Pst-GC/Mse-GC	800-50	23	0	0		
	Pst-AG/Mse-CG	650-100	35	0	0		

	22	Pst-TC/Mse-AT	500-300	24	2	8,3	1,7
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	25	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-50	23	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	37	0	0	
	23	Pst-TC/Mse-AT	500-350	23	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	25	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	35	0	0	
	24	Pst-TC/Mse-AT	500-350	23	0	0	0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	28	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	25	0	0	
Pst-AG/Mse-CG		650-100	35	0	0		
'Grandarosa'	1	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	3	12,0	3,2
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	1	4,2	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	76	0	0	
		Pst-GC/Mse-GC	800-50	50	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	52	0	0	
	2	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	5	20,0	6,5
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	3	12,5	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	52	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	50	0	0	
	3	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	5	20,0	4,8
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	1	4,2	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	48	0	0	
	4	Pst-TC/Mse-AT	500-300	26	0	0	3,3
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	4	16,7	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	52	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	48	0	0	
	5	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	0	0	0,0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	39	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	45	0	0	
	6	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	5	20,0	5,7
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	2	8,3	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	49	0	0	
	8	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	2	8,0	2,4
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	1	4,2	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	50	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	48	0	0	
	9	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	5	20,0	4,8
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	1	4,2	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0	
		Pst-AG/Mse-CG	650-100	48	0	0	
	10	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	0	0	0,0
		Pst-GA/Mse-GA	600-150	24	0	0	
		Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0	
Pst-AG/Mse-CG		650-100	49	0	0		
11	Pst-TC/Mse-AT	500-300	25	3	12,0	2,4	
	Pst-GA/Mse-GA	600-150	25	0	0		
	Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0		
	Pst-AG/Mse-CG	650-100	49	0	0		
12	Pst-TC/Mse-AT	500-350	25	3	12,0	2,4	
	Pst-GA/Mse-GA	600-150	27	0	0		
	Pst-CC/Mse-GG	800-70	51	0	0		
	Pst-AG/Mse-CG	650-100	47	0	0		



Rys. 24. Ocena tożsamości genetycznej dwóch odmian jagody kaczki 'Zojka' i 'Wojtek' podczas ukorzenia w kulturach *in vitro* przy wykorzystaniu markerów AFLP.

Tabela 20. Analiza markerów AFLP dla jagody kaczki podczas ukorzenia w warunkach *in vitro*.

odmiana	nr pożywki	pary starterów AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
				ogółem	polimorficzne		
'Wojtek'	M1	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0	
	M4	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	2,5
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	1	10,0	
	M5	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0	
	M8	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0	
	M9	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	11	0	0	
	M10	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0	
	M11	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	21	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0	
M20	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	2	11,1	4,7	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	25	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	2	7,7		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0		
M23	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	1	5,6	1,4	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	25	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0		
M15	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	25	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0		
M16	Pst-CC/Mse-CC	300-80	18	0	0	0	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	26	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	26	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	10	0	0		

'Zojka'	S1	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	15	0	0	
	S4	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	32	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
	S5	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	1,4
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	2	5,7	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	16	0	0	
	S8	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	1,4
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	2	5,7	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	17	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
	S9	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	32	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
	S10	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	32	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
	S11	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	0
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	32	0	0	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	19	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
	S20	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	1	4,35	2,5
		Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	2	5,7	
		Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0	
		Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0	
S23	Pst-CC/Mse-CC	300-80	24	0	0	0	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	17	0	0		
S15	Pst-CC/Mse-CC	300-80	23	0	0	5,0	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	0	0		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	18	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	15	3	20,0		
S16	Pst-CC/Mse-CC	300-80	24	0	0	6,4	
	Pst-TT/Mse-CC	900-250	35	2	5,7		
	Pst-GC/Mse-TA	850-400	17	0	0		
	Pst-CG/Mse-AG	760-200	15	3	20,0		

Tabela 21. Analiza markerów AFLP dla czosnku 'Ornak' podczas ukorzenia w warunkach *in vitro*.

odmiana	rodzaj traktowania	pary starterów AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]	
				ogółem	polimorficzne		
'Ornak'	termoterapia	Pst-TC/Mse-TC	450-70	21	1	4,76	2,8
		Pst-AA/Mse-AC	330-50	30	2	6,67	
		Pst-CC/Mse-CC	370-70	18	0	0,0	
		Pst-CC/Mse-GG	370-80	15	0	0,0	
		Pst-TT/Mse-CC	420-50	38	1	2,63	
	rybawiryna	Pst-TC/Mse-TC	450-70	20	3	15,0	4,0
		Pst-AA/Mse-AC	330-50	16	0	0,0	
		Pst-CC/Mse-CC	370-70	13	0	0,0	
		Pst-CC/Mse-GG	370-80	19	1	5,26	
		Pst-TT/Mse-CC	420-50	36	0	0,0	

Tabela 22. Analiza markerów AFLP dla maliny podczas ukorzenia w warunkach *in vitro*.

odmiana	pary starterów AFLP	wielkość produktów amplifikacji [pz]	liczba produktów amplifikacji		polimorfizm [%]
			ogółem	polimorficzne	
Polka	Pst-AT/Mse-AT	300 – 50	24	0	0
	Pst-AT/Mse-TC	350 – 50	26	0	0
	Pst-AC/Mse-AC	310 – 80	29	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	450 – 90	51	0	0
	Pst-CC/Mse-GG	400 – 80	47	0	0

Polana	Pst-AT/Mse-AT	300 – 50	22	0	0
	Pst-AT/Mse-TC	350 – 50	24	0	0
	Pst-AC/Mse-AC	310 – 80	32	0	0
	Pst-CC/Mse-CC	450 – 90	61	0	0
	Pst-CC/Mse-GG	400 – 80	55	0	0

Wnioski

- 1/ U truskawki odmiany 'Grandarosa' podczas ukorzenia w warunkach *in vitro* zaobserwowano wyższy poziom zmienności genetycznej niż w przypadku odmiany 'Selva'.
- 2/ U jagody kaczackiej odmiany 'Zojka' podczas ukorzenia w warunkach *in vitro* zaobserwowano wyższy poziom zmienności genetycznej niż w przypadku odmiany 'Wojtek'.
- 3/ Analiza markerów AFLP dla czosnku odmiany 'Ornak' wykazała indukowanie zmienności genetycznej podczas odwirusowywania mikrosadzonek w warunkach *in vitro*.
- 4/ Analiza markerów AFLP dla maliny nie wykazała zmienności u badanych mikrosadzonek podczas ukorzenia w warunkach *in vitro*.

IX. Podsumowanie i wnioski

1/ Określono wpływ różnych czynników (skład pożywki podstawowej, rodzaj i stężenie auksyny oraz cytokinin, pH, biocydów) na ukorzenie pędów *in vitro* truskawki, maliny, jagody kaczackiej oraz czosnku.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice w zdolności do ukorzenia pędów *in vitro* w zależności od genotypu i pomiędzy odmianami tego samego gatunku. Dla każdego genotypu określono warunki efektywnego ukorzenia pędów *in vitro*. Metody ukorzenia mikrosadzonek będą częścią procedur prowadzących do uzyskania wysokiej jakości kwalifikowanego materiału rozmnażeniowego.

2/ Określono warunki i metody wykrywania *Phytophthora* i wirusów w trakcie ukorzenia metodą *in vitro* odmian truskawki, maliny, jagody kaczackiej i czosnku.

Wykonane testy RT-PCR na obecność wirusa CaMV u roślin jagody kaczackiej odmiany 'Zojka' i 'Wojtek', na obecność 4 wirusów (SLV, LYSV, GCLV, OYDV) u czosnku odmiany 'Jarus' i 'Ornak', na obecność 4 wirusów (SMoV, SCrV, SMYEV, SVBV) u truskawki odmiany 'Selva' i 'Grandarosa' oraz na obecność *Phytophthora* spp. u roślin maliny odm. 'Polka' i 'Polana' nie wykazały obecności powyższych patogenów na etapie ukorzenia pędów *in vitro*.

Wykonana analiza sekwencji RNA2 izolatu wirusa krzaczastej karłowatości maliny (*Raspberry bushy dwarf virus*, RBDV) wykrytego w roślinie maliny odm. Polka (izolat Polka 6) wykazała, że izolat ten jest blisko spokrewniony z innymi izolatami RBDV wykrytymi w roślinach z rodzaju *Rubus* w Polsce oraz w innych krajach.

Analiza RFLP wykazała zróżnicowanie w obrębie fragmentu RNA2 badanych izolatów wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki (SMoV). Podobieństwo sekwencji fragmentu RNA2 o długości 1982 nukleotydów izolatu SMoV z truskawki odm. Grandarosa oraz 6 innych polskich izolatów tego wirusa wynosiło 93-98%. Wykazano, że badane izolaty były podobne w 89-93% do analogicznych sekwencji szczepów wirusa z Holandii (GenBank: AJ311876) i Kanady (KU200454, KU200459, KU177219).

3/ Wykonano testy wykrywające zanieczyszczenia bakteryjne na etapie ukorzenia pędów *in vitro* truskawki, maliny, jagody kamiczackiej i czosnku.

Wykonane testy wykazały brak obecności endogennych bakterii w pędach jagody kamiczackiej, niski odsetek zakażeń pędów truskawki i liczne zanieczyszczenia bakteryjne w pędach maliny i czosnku na etapie ukorzenia *in vitro*. Cechy morfologiczne kolonii, reakcja na antybiotyki w testach a także wyniki sekwencjonowania wykazały obecność w pędach maliny na etapie ukorzenia tych samych bakterii, które występowały w kulturach w czasie namnażania i oznaczono je jako *Pseudomonas*. Żółtą bakterię zasiedlającą kultury czosnku zaklasyfikowano do gatunku *Microbacterium testaceum*.

Podjęte próby eliminowania bakterii z tkanek roślinnych maliny i czosnku przy zastosowaniu biocydów w płynie w normalnym ciśnieniu atmosferycznym i w podciśnieniu wykazały, iż bardzo skuteczne jest odkażanie w podciśnieniu 300 mb pod warunkiem zastosowania chlorku rtęci w stężeniu 0,1 lub 0,05%. W przypadku aplikacji płynnej najbardziej skuteczny w ograniczaniu zakażeń bakteryjnych kultur czosnku był PPM oraz rifampicyna w stężeniu 50 mg·L⁻¹. Biocydy w znaczący sposób ograniczały tworzenie korzeni, a PPM zwiększał udział pędów szklistych.

Opracowane metody wykrywania zanieczyszczeń mikrobiologicznych będą częścią procedur prowadzących do uzyskania wysokiej jakości kwalifikowanego materiału rozmnożeniowego wymienionych gatunków.

4/ Oceniono wzrost i rozwój roślin truskawki, jagody kamiczackiej i czosnku oraz ich kondycję fizjologiczną podczas ukorzenia pędów *in vitro*

Wykazano, iż czynniki wpływające na ukorzenie pędów (rodzaj i stężenie auksyny oraz cukru) istotnie wpływają na wzrost i rozwój mikrosadzonki (masę, długość pędu, liczbę liści, powierzchnię blaszki liściowej) oraz na zawartość chlorofilu i aktywność fotosyntetyczną pędów.

Metody uzyskiwania ukorzenionych mikrosadzonek o wysokiej jakości będą częścią procedur prowadzących do uzyskania wysokiej jakości kwalifikowanego materiału rozmnożeniowego.

5/ Oceniono tożsamości oraz stabilność genetyczną roślin truskawki, maliny, jagody kamiczackiej oraz czosnku w fazie ukorzenia pędów *in vitro*.

Analiza ISSR przy użyciu 14 markerów roślin donorowych i rozmnożonych *in vitro* potwierdziła tożsamość genetyczną odmian jagody kamiczackiej zaproponowanych do badań.

Przy użyciu analiz markerów ISSR wykazano, iż na etapie ukorzenia czynnikiem indukującym zmienność u roślin jagody kamiczackiej odm. 'Wojtek' jest IBA (12,5%), natomiast u odmiany 'Zojka'- IAA lub IBA+IAA na poziomie 16,7%. Analiza z wykorzystaniem markerów ISSR nie wykazała zmienności u badanych odmian czosnku.

Przy zastosowaniu markerów AFLP, wyższą zmienność w pędach truskawki na etapie ukorzenia stwierdzono u odmiany 'Grandarosa'(5,7%) niż 'Selva' (1,7%), natomiast w pędach jagody kamiczackiej u odm. 'Zojka' (6,4%) niż odm. 'Wojtek' (4,7%). U mikrosadzonek czosnku odmiany 'Ornak' analiza markerów AFLP wykazała zmienność na poziomie 2,8% u roślin poddanych termoterapii oraz 4% u roślin traktowanych rybawiryną w porównaniu z kontrolą.

Metody oceny tożsamości odmianowej i stabilności genetycznej będą częścią systemu produkcji wysokiej jakości kwalifikowanego materiału rozmnożeniowego wymienionych gatunków.

X. Literatura

- Boxus, P., 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. J. Hort. Sci. 49, 209-210
- Bruinsma J. 1963. The quantitative analysis of chlorophyll A and B in plant extracts. Photochemistry and Photobiology 2: 241-249
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 148-151
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Freijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23; 4407–4414.

XI. Zespół badawczy

Kierownik zadania: dr A.Wojtania

Zastępcy kierownika: dr W. Kiszczak, mgr M. Markiewicz

Wykonawcy: prof. dr hab. T. Orlikowska, dr hab. M. Cieślińska, prof. IO, dr hab. B. Matysiak, prof. IO dr hab. M. Podwyszyńska, prof. IO, dr J. Góraj-Koniarska, dr W. Kiszczak, dr T. Malinowski, dr I. Sowik, mgr U. Kowalska, mgr M. Markiewicz, 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