

## ZASTOSOWANIE KULTUR TKANKOWYCH W MIKROROZMNAŻANIU ZIEMNIAKA

### APPLICATION OF TISSUE CULTURES IN POTATO MICROPROPAGATION

mgr inż. Dorota Michałowska, dr inż. Agnieszka Przewodowska  
mgr inż. Joanna Piskorz, mgr inż. Oksana Olejnik  
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: [michalowska@ziemniak-bonin.pl](mailto:michalowska@ziemniak-bonin.pl)

#### Streszczenie

Mikrorozmnażanie oznacza rozmnażanie wegetatywne roślin w kulturach *in vitro* i pozwala na otrzymanie dużej ilości genetycznie identycznych roślin w stosunkowo krótkim czasie. Efektywność mikropropagacji zależy od wielu czynników, takich jak skład pożywki, rodzaj eksplantatu, genotyp itp. Do najczęściej stosowanych podłoży hodowlanych należy pożywka Murashige i Skooga (1962), która zawiera optymalne składniki mineralne i organiczne. Warunkiem upowszechnienia metody mikro-rozmnażania ziemniaka jest posiadanie zdrowego materiału wyjściowego. Bank genów roślin ziemniaka *in vitro* w Boninie gromadzi i przechowuje materiały wyjściowe oraz udostępnia je placówkom hodowlanym i badawczym do dalszego rozmnażania.

**Słowa kluczowe:** *in vitro*, mikrorozmnażanie, pożywka hodowlana, totipotencja, ziemniak

#### Abstract

Micropropagation means vegetative reproduction of plants as *in vitro* cultures. This technique facilitates the production of a large number of genetically identical plants in a relatively short time. Efficacy of micropropagation depends on many factors, including among other nutrient composition, type of explant, and genotype. The most commonly used culture media is Murashige and Skooga (1962), which contains optimal mineral and organic components. A prerequisite for popularizing the method of potato micropropagation is to have healthy source plants. Potato Gene Bank in Bonin Research Center of IHAR-PIB collects and stores starting materials as *in vitro* plants and makes them available to breeding and research facilities for further reproduction.

**Keywords:** culture medium, *in vitro*, micropropagation, potato, totipotence

**M**etoda kultur *in vitro*, tzn. uprawy w szkle, to szczególny sposób uprawy materiału biologicznego w warunkach sterylnych. Hodowla roślin *in vitro* oparta jest na zjawisku totipotencji, czyli zdolności komórek roślinnych do dzielenia się oraz odtwarzania poszczególnych organów i całego organizmu. Cecha ta po raz pierwszy została opisana, jako element teorii komórkowej na początku XIX w. przez niemieckich przyrodników Schleidena, Schwanna i Virchowa. W 1965 r. Murashige (USA) opracował sposób klonalnego rozmnażania storczyków, dzięki czemu stało się możliwe rozmnażanie roślin na skalę produkcyjną. Mikrorozmnażanie – rozmnażanie klonalne, mikropropagacja – początkowo znalazło zastosowanie m.in. w produkcji roślin, które trudno rozmnażają się wegetatywnie tradycyjnymi metodami lub szybko ulegają degeneracji w warunkach polowych (np.

w warunkach polowych (np. ziemniak). Obecnie mikrorozmnażanie stosuje się w przypadku prawie wszystkich roślin ozdobnych, uprawnych, a także owocowych. Kultury roślinne *in vitro* mają również szerokie zastosowanie m.in. w produkcji nowych odmian, w rozmnażaniu gatunków rzadkich i ginących oraz w celu zachowania zasobów genowych roślin.

Cząstka „mikro” w nazwie techniki mikro-rozmnażania odnosi się do niewielkiej ilości materiału wyjściowego, natomiast liczba uzyskanych w ten sposób roślin potomnych może być bardzo duża.

Rozmnażanie wegetatywne roślin w kulturach *in vitro* można prowadzić poprzez:

- pobudzenie do rozwoju pąków bocznych – to metoda najlepiej poznana i wykorzystywana do mikrorozmnażania m.in. ziemniaka. Najczęściej stosowanymi eks-

plantatami do inicjacji kultur in vitro w tej metodzie są: merystemy pąków wierzchołkowych lub bocznych, wierzchołki pędów, pąki kątowe (boczne) oraz fragmenty pędów z węzłem, parą liści i pąkiem bocznym. Eksplantaty po wyłożeniu na pożywkę wznawiają wzrost i rozwijają się w pojedynczą roślinę. Zaletą tej metody jest poprawienie zdrowotności roślin, ponieważ kultury merystemów umożliwiają otrzymywanie materiału wolnego od patogenów, zwłaszcza od wirusów. Wielu badaczy dowiodło, że merystem wierzchołkowy rośliny zainfekowanej wirusem może nie zawierać cząstek wirusa. Merystem taki, wyizolowany i umieszczony na podłożu hodowlanym, rozwija się w pęd, który można pobudzić do rozkrzewiania i ukorzenienia, otrzymując rośliny wolne od wirusów. Właściwość ta jest wykorzystywana w banku genów in vitro ziemniaka w Boninie przy wprowadzaniu odmian i rodów perspektywicznych do długoterminowego przechowywania;

- formowanie pąków przybyszowych – metoda ta jest wykorzystywana w sytuacji, kiedy rośliny z trudem wytwarzają pąki boczne, np. cebulowe (*Liliaceae*, *Amaryllidaceae*). W różnych częściach rośliny z tkanek mogą powstawać wierzchołki pędów zwane przybyszowymi. Tworzą się one na różnych organach: korzeniach, łodygach, liściach, łuskach cebulowych, pędach kwiatowych lub na kalusie. Na powstawanie i rozwój pąków przybyszowych duży wpływ mają rodzaj tkanki, gatunek rośliny i jej kondycja, a także warunki fizyczne hodowli, zwłaszcza światło i temperatura;

- embriogenezę somatyczną – to proces biologiczny, podczas którego w warunkach in vitro formują się z komórek wegetatywnych zarodki. Metoda ta znalazła zastosowanie tam, gdzie uzyskanie nasion może być trudne i długotrwałe, np. w rozmnażaniu drzew leśnych.

Wynik hodowli zależy od wielu czynników, m.in. od właściwości biologicznych rośliny, składu pożywki czy warunków hodowli. Kultury in vitro prowadzi się w specjalnie przygotowanych pomieszczeniach, tzw. fitotronach, z regulowaną intensywnością światła, odpowiednią temperaturą i wilgotnością oraz długością dnia i nocy (fotoperiodym).

Kluczową kwestią w hodowli in vitro jest zachowanie sterylnych warunków, więc zarówno materiał roślinny, szkło, narzędzia, jak i pożywki muszą być wyjałowione. Czynności związane z izolacją i pasażowaniem fragmentów roślin należy wykonywać w tzw. komorach z laminarnym przepływem sterylnego powietrza. Narzędzia, jak skalpele i pęsety, sterylizuje się w 95-proc. alkoholu lub opala w elektrycznej wyżarzarko w temperaturze ok. 800°C (fot. 1 i 2).



Fot. 1. Stanowisko pracy podczas mikrorozmnażania (wszystkie zdjęcia D. Michałowska)



Fot. 2. Wyżarzarka do narzędzi

Bardzo istotne znaczenie w procesie mikrorozmnażania roślin ma skład podłoża hodowlanego oraz jego rodzaj. Pożywka ma do spełnienia następujące zadania:

- dostarcza eksplantatom wodę, mikro- i makroelementy oraz inne substancje, któ-

rych komórki nie mogą samodzielnie wytworzyć;

- stanowi środowisko fizykochemiczne właściwe dla rozwoju eksplantatu;
- wykazuje zdolność buforową w celu utrzymania właściwego pH;
- wykazuje zdolność do pochłaniania szkodliwych produktów przemiany materii wydzielanych przez eksplantat.

Składniki pożywek można podzielić na mineralne, jak mikro- i makroelementy, oraz organiczne. Składniki organiczne to głównie cukry, witaminy, aminokwasy i regulatory wzrostu, np. auksyny, cytokiny czy gibbereliny. Jeśli składniki są rozpuszczone w wodzie redestylowanej, mamy do czynienia z pożywką płynną bądź stałą, gdy jest zestalona agarą. Istnieje wiele różnych pożywek, które są ściśle dostosowane do wymagań poszczególnych roślin. Do najbardziej znanych należą: MS (Murashige i Skoog 1962), LS (Linsmaier i Skoog 1965), B5 (Gamborg i in. 1968), L2 (Philips i Collins 1979) i HE (Heller 1952).

Proces mikrorozmnażania można podzielić na trzy etapy.

### Etap I – założenie kultury

Planując rozmnażanie klonalne, należy kierować się kilkoma zasadami. Przede wszystkim trzeba wybierać rośliny zdrowe, nieporażone chorobami i szkodnikami. Roślina, z której będzie pobierany eksplantat, powinna być młoda i wykazywać intensywny wzrost (fot. 3). Warto pamiętać, że mimo iż mikropropagacja pozwala na całoroczną produkcję roślin, to istnieją okresy, kiedy współczynnik namnażania jest większy. W przypadku ziemniaka są to wiosna i lato.

Eksplantaty poddaje się wstępnej dezynfekcji 70-proc. etanolem, który usuwa powierzchniowe zabrudzenia oraz bakterie i grzyby. Następnie należy zastosować środek odkażający, np. 0,4-proc. podchloryn sodu (NaOCl), który usuwa pozostałe patogeny, w tym formy przetrwalnikowe. Po dezynfekcji eksplantaty są trzykrotnie płukane wodą redestylowaną. Po wykonaniu tych czynności można mieć pewność, że materiał jest czysty i nie doprowadzi do powstania zakażeń. Tak przygotowany materiał roślinny należy wyłożyć na podłoże hodowlane.



Fot. 3. Roślina *in vitro* na wstępnym etapie mikrorozmnażania

Korzystając z zasobów banku genów ziemniaka *in vitro*, można pominąć ten etap mikrorozmnażania. Zgromadzone w banku genotypy są utrzymywane w postaci roślin *in vitro* i stanowią materiał wyjściowy do dalszego pasażowania. Atutem banku *in vitro* ziemniaka jest zdrowotność zgromadzonych zasobów. Wszystkie genotypy są wolne od wirusów ziemniaka S, M, Y X, A i liściozwoju oraz od bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* wywołującej bakteriozę pierścieniową, *Ralstonia solanacearum* (sprawcy śluzaka) i wiroidu wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd).

### Etap II – namnażanie

Na tym etapie materiał roślinny jest powielany, dzielony i przenoszony na świeżą pożywkę (fot. 4). Trwa to aż do uzyskania pożądanej liczby egzemplarzy. Długość pojedynczego pasażu wynosi od 3 do 6 tygodni. Za każdym razem rośliny utrzymuje się w komorach hodowlanych (fitotronach) w temperaturze 20/18°C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 8 W/m<sup>2</sup> z zachowaniem 16-godzinnego fotoperiodu. Nie wolno dopuścić do starzenia się kultur, ponieważ może to spowodować obniżenie żywotności i zdolności do ukorzeniania w następnym pasażach.

Metodą stosowaną w mikrorozmnażaniu ziemniaka jest tzw. metoda jednowęzłowych pędów (fot. 5). Polega ona na wykładaniu pędów zawierających po jednym węźle na pożywkę pozbawioną regulatorów wzrostu. Z każdego pasażowanego eksplantatu wyrasta jedna roślina *in vitro*.



Fot. 4. Rośliny in vitro na etapie namnażania



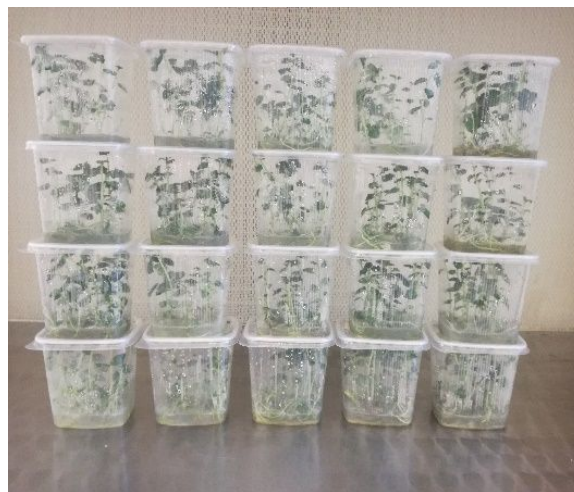
Fot. 5. Jednowęzłowe fragmenty roślin in vitro

Pędy ziemniaka, jeśli są hodowane na pożywce o niskim potencjale osmotycznym i przy krótkim dniu (8 godzin) lub w ciemności, mogą tworzyć tzw. mikrobulwy. Tuberyzacja in vitro jest procesem pożądanym w mikro-rozmnażaniu, ponieważ mikrobulwy ze względu na swoją całkowitą zdrowotność mogą stanowić alternatywę w dalszej hodowli dla roślin in vitro.

### **Etap III – adaptacja do warunków in vivo**

Aklimatyzacja jest konieczna dla przeniesienia roślin z kultur w szkle do warunków szklarniowych. Rośliny in vitro hartuje się przez obniżenie temperatury hodowli i zwiększenie natężenia światła w fitotronach. Wynika to z faktu, że warunki panujące w komorach hodowlanych znacząco odbiegają od tych w szklarni (fot. 6). Rośliny wysadza się do substratu torfowego i umieszcza w optymalnych warunkach. Z chwilą ukorze-

nienia się rośliny proces mikro-rozmnażania zostaje zakończony (fot. 7).



Fot. 6. Rośliny in vitro przed wysadzeniem do szklarni



Fot. 7. Rośliny in vitro wysadzone w szklarni

Mikropropagacja jako metoda rozmnażania wegetatywnego w kulturze in vitro jest używana do masowego mnożenia roślin na skalę produkcyjną od lat 70. XX w. Jest to przypuszczalnie najszybciej rozwijająca się gałąź branży rolno-ogrodniczej. Szacuje się, że każdego roku w laboratoriach roślin in vitro namnaża się ok. 500 gatunków w liczbie ok. miliarda sztuk.

Metoda rozmnażania klonalnego, jak każda inna, ma swoje zalety i wady.

### **Zalety rozmnażania in vitro:**

1. Ze względu na to, że mikro-rozmnażanie odbywa się w laboratorium, w warunkach odizolowanych od środowiska zewnętrznego, gdzie można sterować warunkami, w jakich rosną rośliny, można wykonywać

mnożenie przez cały rok. Jest to całkowite przeciwieństwo tradycyjnej hodowli, która jest ściśle uzależniona od warunków zewnętrznych.

2. Odmiana może być namnażana bez utraty rośliny matecznej.

3. Rośliny potomne będą identyczne pod względem fenotypowym i genotypowym jak roślina wyjściowa.

4. Otrzymane rośliny są wolne od patogenów i chorób.

5. Można uzyskać bardzo dużą liczbę sadzonek w relatywnie krótkim czasie.

6. Materiał roślinny można mnożyć z dala od jej naturalnego środowiska.

7. Namnożony materiał można łatwo transportować.

8. Ułatwiona jest wymiana międzynarodowa, ponieważ wiele krajów stosuje uproszczoną procedurę fitosanitarną przy imporcie roślin *in vitro*.

#### Wady rozmnażania *in vitro*:

1. Konieczność posiadania wyspecjalizowanego laboratorium kultur tkankowych.

2. Niezbędny jest dobrze wykwalifikowany personel.

#### Literatura

1. Jerzy M., Krzywińska A. 2005. Rozmnażanie wegetatywne roślin ozdobnych. [W:] Rozmnażanie roślin ozdobnych *in vitro*. Red. Jerzy M., Krzywińska A. PIWRiL Poznań: 83-105; 2. Malepszy S. (red.) 2004. Biotechnologia roślin. PWN Warszawa: 608 s.; 3. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.* 15: 473-497; 4. Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Mikrorozmnażanie – technologia wykorzystywana w produkcji zdrowych sadzonek ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 3: 3-7; 5. Srivastava A. K., Diengdob L. C., Rai R., Bag T. K., Singh B. P. 2012. *In vitro* micropropagation and micro-tuberization potential of selected potato varieties. – *Indian. J. Hill Farming* 25(2): 14-17; 6. Szopa J., Kostyń K. 2006. Kultury komórkowe i rośliny transgeniczne w biotechnologii. – *Biotechnologia* 4(75): 7-17; 7. Zaklukiewicz K., Turska E., Sekrecka D., Jędrzejowska E. 1995. Technologia rozmnażania roślin ziemniaka, produkcja minibułw oraz ich wykorzystanie w hodowli i nasiennictwie. *Instr. Inst. Ziemn. Bonin*: 40 s.; 8. Zenkteler M., Zenkteler E. 2013. 65 years of *in vitro* culture in Poland. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 82(3): 183-192; 9. [https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/mikrorozmnażanie\\_roślin\\_w\\_hodowlach\\_in\\_vitro.pdf](https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/mikrorozmnażanie_roślin_w_hodowlach_in_vitro.pdf); 10. [https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/wprowadzenie\\_do\\_in\\_vitro\\_dowolnej\\_rośliny.pdf](https://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/wprowadzenie_do_in_vitro_dowolnej_rośliny.pdf)

