

## Nasiennictwo i odmianoznawstwo

# MIKROROZMNAŻANIE – TECHNOLOGIA WYKORZYSTYWANA W PRODUKCJI ZDROWYCH SADZENIAKÓW ZIEMNIAKA

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska  
IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie  
e-mail: [sekrecka@ziemniak-bonin.pl](mailto:sekrecka@ziemniak-bonin.pl)

### Streszczenie

Warunkiem szybkiego upowszechnienia metody mikrorozmnażania jest posiadanie minimalnej ilości zdrowych roślin *in vitro*. To minimum zapewnia Bank Genów Ziemniaka *in Vitro* w IHAR-PIB w Boninie. Jest tu przechowywany materiał zdrowy, uwolniony od powszechnie występujących w Polsce wirusów i patogenów kwarantannowych. Skorzystanie z takiego materiału znacznie ułatwia mikrorozmnażanie, gdyż eliminuje długotrwałe uwalnianie genotypów od wirusów i ogranicza zakres badań do kontroli zdrowotności na pierwszym etapie rozmnażania. Opracowano i wdrożono metodę mikrorozmnażania opartą na kulturach sadzonek *in vitro* z jednym międzywęźlem. Jest ona przydatna w wielkotowarowym systemie uprawy, zapewniając ciągłą produkcję mikrosadzonek identycznych z genotypem rośliny matecznej. Rośliny *in vitro* mogą być mnożone na kolejne rośliny *in vitro* lub wykorzystane do produkcji mikrobulw. Mikrobulwy i mikrosadzonki są sadzone pod osłonami i uzyskuje się z nich minibulwy, które wysadza się w polu jako materiał przedbazowy PB<sub>II</sub>.

**Słowa kluczowe:** Bank Genów, *in vitro*, mikrobulwy, mikrorozmnażanie, minibulwy, ziemniak

**M**ikrorozmnażanie, czyli rozmnażanie wegetatywne roślin w kulturach *in vitro*, jest techniką powszechnie używaną w biotechnologii oraz do masowego mnożenia roślin na skalę produkcyjną. Technika ta znalazła zastosowanie m.in. w produkcji roślin, które trudno rozmnażają się wegetatywnie metodami tradycyjnymi lub szybko ulegają degeneracji w warunkach polowych (np. ziemniak *Solanum tuberosum* L.).

Metoda kultur *in vitro* jest doskonała od początku XX wieku. W Polsce prekursorem hodowli tkanek roślinnych *in vitro* był prof. Jerzy Czosnowski, który w 1948 r., po odbyciu stażu naukowego w Paryżu, powrócił na uniwersytet w Poznaniu i podjął prace z tymi kulturami. I tak od tego roku, tj. od 67 lat, prowadzone są badania nad doskonaleniem technik *in vitro* wielu gatunków (Zenkteler M., Zenkteler E. 2013). W 1965 r. Murashige (USA) opracował sposób klonalnego roz-

mnażania storczyków i dzięki temu od 50 lat możliwe jest rozmnażanie roślin *in vitro* na skalę produkcyjną. Metoda ta została zaadaptowana do rozmnażania innych ważnych gospodarczo roślin, szczególnie ozdobnych i sadowniczych. W niewielkim stopniu znalazła zastosowanie w rozmnażaniu roślin rolniczych (ziemniaków, zbóż), ale i tu zauważa się tendencję wzrostową.

Obecnie na świecie za pomocą kultur *in vitro* produkuje się ok. 800 mln sztuk roślin rocznie, z czego 90% stanowią rośliny ozdobne. Produkcja europejska wynosi ok. 200 mln sztuk rocznie, a głównym producentem w Europie jest Holandia, następnie Francja, Polska, Włochy i Niemcy. Poza Europą czołowymi producentami roślin w laboratoriach *in vitro* są USA, 110 mln szt., i Indie – 30 mln szt. ([www.pg.gda.pl](http://www.pg.gda.pl)). Jest to prawdopodobnie najszybciej rozwijająca się gałąź branży rolno-ogrodniczej z wieloma powsta-

jącymi każdego roku na całym świecie nowymi firmami.

W Polsce laboratoria zajmują się mikrorozmnażaniem głównie roślin ozdobnych (gerbera, azalia, różanecznik, storczyk, fikus, lilia, chryzantema, gloksynia, goździk, paproć, primula) oraz borówki wysokiej, truskawki, żurawiny i jeżyny. Mikrorozmnażanie ziemniaka na skalę produkcyjną prowadzą 3 laboratoria kultur tkankowych: w Hodowli Ziemniaka w Zamartem oraz Pomorsko-Mazurskiej Hodowli Ziemniaka w Strzeżeniu i jej oddziale w Szyldaku.

Warunkiem szybkiego upowszechnienia metody mikrorozmnażania w produkcji sadzeniaków jest posiadanie minimalnej ilości zdrowych roślin *in vitro*. To minimum zapewnia Bank Genów Ziemniaka *in vitro* w Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka (ZNiOZ) IHAR-PIB w Boninie, w którym od 1980 r. są gromadzone i przechowywane zasoby genowe ziemniaka w formie roślin *in vitro*. Jest to materiał zdrowy, uwolniony od powszechnie występujących w Polsce wirusów ziemniaka, a także od patogenów kwarentanowych, tj. wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd), bakteriozy pierścieniowej (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) oraz szluzaka (*Ralstonia solanacearum*). Skorzystanie z takiego materiału znacznie ułatwia zastosowanie metody mikrorozmnażania, gdyż eliminuje długotrwałe uwalnianie genotypów od wirusów i ogranicza zakres badań do kontroli zdrowotności na pierwszym etapie rozmnażania.

W ZNiOZ w Boninie opracowano i wdrożono metodę mikrorozmnażania ziemniaka opartą na kulturach sadzonek *in vitro* z jednym międzywęźlem (Zaklukiewicz i in. 1995). Jest ona przydatna w wielkotowarowym systemie uprawy, zapewniając ciągłą produkcję mikrosadzonek identycznych z genotypem rośliny matecznej.

### **Mikrorozmnażanie ziemniaka na etapie roślin *in vitro***

Mikrorozmnażanie to wegetatywne rozmnażanie roślin w warunkach laboratoryjnych na sztucznym podłożu. „Mikro” w nazwie tej techniki odnosi się do niewielkiej ilości mate-

riału wyjściowego, z którego otrzymuje się nieograniczoną liczbę roślin potomnych. Poza wysokim współczynnikiem rozmnażania zaletą tej metody jest duże wyrównanie fenotypowe i genotypowe roślin. Wszystkie prace oraz wzrost roślin prowadzi się w ściśle kontrolowanych warunkach, dzięki czemu materiał zachowuje wysoką zdrowotność.

W pierwszym etapie pracy pozyskiwane są subkultury (eksplantaty) z roślin utrzymywanych w banku genów *in vitro* i przeszczepiane na standardową pożywkę Murashige-Skooga (1962), która nie zawiera hamujących substancji wzrostowych (D-Mannit, ABA). Kolejne pasáže są wykonywane co 3-4 tygodnie, a eksplantaty umieszczane na świeżej pożywce MS. 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.

Na podstawie wieloletnich obserwacji określono wyraźne różnice w rozwoju roślin *in vitro* pomiędzy genotypami ziemniaka (Zaklukiewicz, Sekrecka 1994). Można przypuszczać, że różnice te mają związek z morfologią danej odmiany w warunkach naturalnych (Srivastava i in. 2012a). Współczynnik rozmnażania na etapie *in vitro* dla danego genotypu jest w miarę stały i kształtuje się w zakresie od 5 do 10, co umożliwia zaplanowanie prac przy mikrorozmnażaniu. W praktyce oznacza to, że po 3-4 tygodniach z 1 eksplantatu na pożywce wyrasta roślina z 5-10 międzywęźłami. Teoretycznie z 1 rośliny *in vitro* pobranej z Banku, o współczynniku rozmnażania 6, po 12 pasażach można uzyskać ponad 2 miliardy roślin identycznych z rośliną mateczną.

Mikrosadzonki otrzymane w procesie mikrorozmnażania w praktyce mogą być bezpośrednio wysadzone w polu lub służyć do produkcji minibulw pod osłonami. W warunkach Polski bezpośrednio wysadzanie roślin ziemniaka *in vitro* nie jest zalecane, gdyż delikatne roślinki są bardziej podatne na infekcje wirusową (Zaklukiewicz i in. 1995). Jako zasadę należy przyjąć wykorzystanie w pierwszych rozmnożeniach polowych minibulw (Button 1992, Kostiw i in. 1994).



Fot. 1. Etapy mikrorozmnażania ziemniaka: rośliny in vitro, produkcja mikrobulw, mikrobulwy na tle sadzeniaka, rośliny in vitro wysadzone w szklarni, minibulwy, plantacja nasienna (fot. D. Sekrecka)

### Produkcja mikrobulw ziemniaka

Mikrobulwy to bulwy ziemniaka uzyskane w procesie mikrotuberyzacji w warunkach in vitro. Są na ogół bardzo małe, ich średnica nie przekracza 10 mm i ważą średnio 0,7 g (Struik, Wiersema 1999). Do ich produkcji stosuje się jednowęzłowe fragmenty roślin in vitro, które są poddawane działaniu chemicznych i fizycznych czynników indukujących tuberyzację. Współczynnik rozmnażania jest stosunkowo niski, gdyż z 1 eksplantatu po 3 miesiącach prowadzenia kultur uzyskujemy od 1 do 2 mikrobulw (Sekrecka, Michałowska 2014). Główną zaletą tej metody jest produkcja bulw w kontrolowanym, zamkniętym środowisku i niezależnie od pory roku. Dodatkowym atutem są stosunkowo niskie koszty, ponieważ mikrotuberyzacja przebiega w całkowitej ciemności.

Do czynników istotnych w procesie mikrotuberyzacji należy m.in. poziom sacharozy i obecność regulatorów wzrostu w pożywce oraz temperatura inkubacji i światło. Sacharoza stanowi źródło energii, a jej optymalne stężenie w pożywce wynosi 8%. Zarówno niższe, jak i wyższe stężenie sacharozy może mieć negatywny wpływ na liczbę i rozmiar uzyskanych mikrobulw (Xu i in. 1998). Dodatek hormonów wzrostu do pożywki może działać stymulująco lub hamująco na tuberyzację (Saniewski 1997), nie jest jednak niezbędny do formowania bulwek w szkle (Struik, Wiersema 1999). W Hodowli Roślin w Szyldaku (obecnie oddział PMHZ) prace hodowlane z zastosowaniem mikrobulw są

prowadzone od 1997, tj. od 18 lat. Mikrobulwy produkuje się w ciągu całego roku, a następnie wysadza pod osłonami. Tak prowadzona jest hodowla zachowawcza wszystkich odmian (Bruski 2006).

Coraz większy nacisk kładzie się na stosowanie bezhormonalnych systemów mikrorozmnażania. Do tej pory poświęcano im mało uwagi, prawdopodobnie ze względu na stosunkowo powolny i mało efektywny wzrost eksplantatów. Opracowanie systemu mikrorozmnażania z pominięciem udziału hormonów jest wskazane, gdyż systemy takie umożliwiają produkcję bez późniejszych problemów związanych z zakłóconą równowagą hormonalną i mogą być użyteczne komercyjnie.

### Produkcja minibulw pod osłonami

Pod osłonami (szklarnia, namiot foliowy czy siatkowy) znacznie łatwiej zapewnić prawidłowy i jednocześnie przyspieszony wzrost roślin w celu uzyskania relatywnie dużej liczby bulw przydatnych do produkcji polowej (Zaklukiewicz, Sekrecka 1994). Bulwy pochodzące z pierwszego pokolenia roślin in vitro lub mikrobulw nazwano minibulwami. Liczne badania przeprowadzone w celu optymalizacji warunków produkcji minibulw pod osłonami wskazują, że na wielkość i jakość plonu ma wpływ wiele czynników. W pierwszej kolejności są to: genotyp oraz termin i gęstość sadzenia, zasobność podłoża, a także zabiegi pielęgnacyjno-ochronne.

Poza zapewnieniem odpowiednich warunków fitosanitarnych (dezynfekcja szklarni, namiotów, wymiana podłoża, utrzymanie pomieszczeń wolnych od szkodników – mszyc, przędziorków, wciornastków – ochrona przed zarazą ziemniaka itp.) w produkcji minibulw istotną rolę odgrywa, podobnie jak w uprawie polowej, skład podłoża, jego struktura, odpowiednie pH i zasobność w składniki pokarmowe (makro- i mikroelementy).

Jednym z najbardziej istotnych czynników określających wartość nasienną minibulw (poza zdrowotnością) jest ich wielkość. Liczne badania wskazują na mniejszą przydatność bulw najdrobniejszych (o średnicy poniżej 1 cm), stąd też w produkcji zasadniczą rolę odgrywają warunki zapewniające maksymalny udział w plonie frakcji większych, tj. o średnicy powyżej 1 cm. Na wielkość minibulw istotny wpływ ma gęstość sadzenia na jednostce powierzchni oraz wiek fizjologiczny wysadzanych roślin *in vitro* i mikrobulw. Optymalny wiek roślin wysadzanych pod osłonami wynosi ok. 4 tygodni; uzyskiwany plon minibulw jest o ok. 50% wyższy w porównaniu z plonem roślin 2-tygodniowych (Sekrecka 2000, Lewosz i in. 2001).

### **Minibulwy – sadzeniaki w hodowli zachowawczej**

Mikrorozmnażanie pozwala na znaczne usprawnienie hodowli zachowawczej, np. na rezygnację z klonowego prowadzenia rozmnożeń czy też zmniejszenie zakresu badań dla oceny zdrowotności (Pawlak 1996). Materiałem wyjściowym do hodowli zachowawczej odmian są minibulwy uzyskane we własnych laboratoriach kultur tkankowych jednostek hodowlanych (Siewierska 2011). Minibulwy służą przede wszystkim jednostkom hodowlanym prowadzącym hodowlę zachowawczą, której celem jest utrzymanie genetycznie utrwalonych cech danej odmiany ziemniaka (Turska 1995). Produktem końcowym tego odtwarzania w 2-3-letnim cyklu są sadzeniaki określone mianem materiału matecznego. Stosując techniki mikrorozmnażania, można – poza gwarancją wysokiej zdrowotności materiału – szybko, w ciągu 2 lat, dostosować podaż sadzeniaków danej odmiany do zmieniającego się popytu.

Przed wysadzeniem minibulw w polu zasadnicze znaczenie ma ich właściwe przygotowanie, tj. przechowywanie, dokładne rozfrakcjonowanie i odpowiednie podkiełkowanie. Wpływ temperatury w okresie przechowywania na wartość nasienną minibulw jest podobny jak w tradycyjnej produkcji sadzeniaków. Wyższe temperatury przyspieszają proces starzenia się minibulw poprzez obniżenie ich potencjału rozwojowego. Dla zachowania ich dobrej wartości nasiennej konieczne jest utrzymanie stałych, niskich temperatur. Szczególnie jest to ważne przy dłuższym, prawie 10-miesięcznym przechowywaniu bulw ze zbioru wiosennego.

Dotychczas nie opracowano zmechanizowanej techniki sadzenia minibulw, dlatego w przypadku najmniejszych frakcji zaleca się wyłącznie ręczne sadzenie. Sposób ten ogranicza uszkodzenia kielków i zapewnia lepszy, wyrównany wzrost roślin. Niezależnie od schematu rozmnożeń każdą z wydzielonych frakcji bulw dobrze jest wysadzać w oddzielnym „bloku”. W ten sposób, poza lepszym wyrównaniem łanu, możliwe jest przeprowadzenie w trakcie wegetacji dodatkowych zabiegów pielęgnacyjnych i ochronnych dla poszczególnych partii materiału.

### **Podsumowanie**

Ziemniak jest podatny na manipulacje w hodowli tkankowej. Ponieważ tkanka łatwo się mnoży, może być wykorzystana na szeroką skalę w produkcji wysokiej jakości materiału sadzeniakowego. Kultura merystemów w połączeniu z termoterapią i/lub chemioterapią jest obecnie standardowo stosowana w celu uzyskania zdrowych, wolnych od patogenów roślin ziemniaka. Rośliny *in vitro* mogą być mnożone na kolejne rośliny *in vitro* lub wykorzystane do produkcji mikrobulw. Mikrobulwy i mikrosadzonki są sadzone pod osłonami i uzyskuje się z nich minibulwy (Srivastava i in. 2012b), które są wysadzane w polu jako materiał przedbazowy PB<sub>II</sub>. Wykorzystanie mikrorozmnażania w hodowli zachowawczej zapobiega szerzeniu się patogenów kwarantannowych w produkcji nasiennej, a także umożliwia produkcję sadzeniaków odmian ziemniaka o niskiej odporności na wirusy.

Metoda ta, jak każda inna, ma swoje zalety i wady. Do **zalet** należą:

1. Odmiana może być namnażana bez utraty rośliny matecznej, często unikatowej.
2. Otrzymane sadzonki mogą być identyczne z rośliną mateczną.
3. Materiał roślinny można mnożyć z dala od jego naturalnego środowiska.
4. Można uzyskać bardzo dużą liczbę sadzonek w relatywnie krótkim czasie.
5. Proces mnożenia jest niezależny od pogody i może być kontynuowany przez cały rok.
6. Ułatwiona jest wymiana międzynarodowa, ponieważ wiele krajów stosuje uproszczoną procedurę fitosanitarną przy imporcie roślin mnożonych in vitro.
7. Dopuszczalne jest przechowywanie mikro-roślinek przez kilka miesięcy w obniżonej temperaturze, co pozwala na spokojną, rozłożoną w czasie produkcję in vitro i wysadzanie dużej liczby roślin w optymalnym terminie.
8. Łatwy transport rozmnożonego materiału.

#### Wady metody:

1. Stosunkowo wysokie koszty produkcji minibulw i mikrobulw.
2. Konieczność posiadania wyspecjalizowanego laboratorium kultur tkankowych z dobrze wykwalifikowanym i doświadczonym personelem.

#### Literatura

**Bruski R. 2006.** Zastosowanie mikrorozmnażania w hodowli i nasiennictwie ziemniaka – *Ziemn. Pol.* 4: 8-12; **2. Button P. 1992.** Commercial minitubers production. *Abstr. Agron. Sect. Meet Finlandia*: 112-116; **3. Kostiw M., Rembeza J., Chotkowski J., Turska E., Ratuszniak E. 1994.** Kierunki zmian hodowli i nasiennictwa ziemniaka. – *Hod. Rośl. Nas. Biul. Branż.* 4/5: 29-38; **4. Lewosz J., Stypa I., Turska E., Sekrecka D. 2001.** Status of potato germplasm collections in Poland. Report of a Working Group on Potato. ECP/GRIPGRI, Wageningen: 46-52; **5. Murashige T., Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. – *Phys. Plant.* 15: 473-497; **6. Pawlak A. 1996.** Produkcja

nasienna w Zakładzie Naukowo-Hodowlanym Zamar-te. – *Ziemn. Pol.* 4: 23-27; **7. Saniewski M. 1997.** Kwas jasmonowy i związki pokrewne. [W:] *Regulatory wzrostu i rozwoju Roślin*. Pr. zbior. pod red. L. S. Jan-kiewiczza. T. 1. PWN Warszawa: 95-102; **8. Sekrecka D. 2000.** Wpływ składu pożywek na rozwój i plonowa-nie roślin in vitro kilku odmian ziemniaka. [W:] *IX Ogól-nopol. Konf. Kultur in vitro i Biotechnologii Roślin*. Gdańsk, 10-13.09.2000. *Kat. Biotech. UG&AMG Gdańsk*: 143; **9. Sekrecka D., Michałowska D. 2014.** Wpływ wybranych składników pożywki na produkcję mikrobulw. – *Ziemn. Pol.* 1: 4-7; **10. Siewierska M. 2011.** Hodowla i nasiennictwo ziemniaka w Pomorsko-Mazurskiej Hodowli Ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 3: 46-50; **11. Srivastava A. K., Diengdoh L. C., Rai R., Bag T. K., Singh B. P. 2012a.** In Vitro Micropropaga-tion and Micro-tuberization Potential of selected Potato Varieties. – *Indian J. Hill Farming* 25(2): 14-17; **12. Sri-vastava A. K., Diengdoh L. C., Rai R., Bag T. K. 2012b.** Tissue Culture – Technology Harnessed for Potato Seed Production. – *Keanean J. Sci.* 1: 80-86; **13. Struik P. C., Wiersema S. G. 1999.** Production of pre-basic seed. [In:] *Seed Potato Technology*. Wage-ningen Pers.: 173-216; **14. Turska E. 1995.** Znaczenie minibulw w produkcji ziemniaka w Polsce. – *Ziemn. Pol.* 4: 21-25; **15. Xu X., Lammeren A. van, Vermeer E., Vreugdenhil D. 1998.** The role of gibberelin, ab-scisic acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. – *Phys. Plant.* 117: 575-584; **16. Za-klukiewicz K., Sekrecka D. 1994.** Mikrorozmnażanie jako metoda przygotowania wolnych od porażenia materiałów wyjściowych dla hodowli zachowawczej ziemniaka. I. Wyniki badań na etapie rozmnażania in vitro. II. Wyniki badań na etapie produkcji pierwszego pokolenia bulw w szklarni. – *Hod. Rośl. Nas. Biul. Branż.* 4/5: 21-28; **17. Zaklukiewicz K., Turska E., Sekrecka D., Jędrzejowska E. 1995.** Technologia rozmnażania roślin ziemniaka, produkcja minibulw oraz ich wykorzystanie w hodowli i nasiennictwie. *Instr. Inst. Ziemn. Bonin*: 40 s; **18. Zenkteler M., Zenkteler E. 2013.** 65 years of in vitro culture in Poland. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 82 (3), 183-192; **19. www.pg.gda.pl /chem/Katedry/Leki/Dydaktyka/Kultury/lab/mikroroz-mnażanie**