



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Vybudovanie výskumného centra "AgroBioTech" ITMS 26220220180

Partner	Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre (Partner 2)
Aktivita	3.1 Aplikovaný výskum v rastlinných biotechnológiách
Zodpovedná osoba	RNDr. Alena Gajdošová, CSc.
Cieľ	B. Realizácia aplikovaného výskumu v oblasti rastlinných biotechnológií
Výstup 3	Vypracované metodiky pre mikropropagácia vybraných druhov a odrôd drobného ovocia
Autori	RNDr. Alena Gajdošová, CSc. RNDr. Gabriela Libiaková, CSc. Mgr. Júlia Hunková

V Nitre, dňa:

RNDr. Alena Gajdošová, CSc.
zodpovedná osoba odbornej aktivity 3.1

prof. Ing. Marián Brestič, PhD.
predseda vedeckého výboru a vedecký
garant



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

Metodiky pre mikropropagáciu vybraných druhov a odrôd drobného ovocia

Autori: Alena Gajdošová, Gabriela Libiaková, Júlia Hunková

1. Stav riešenia problematiky v zahraničí a na Slovensku

Mikropropagácia je spôsob množenia rastlinného materiálu využitím moderných metód pletivových kultúr s cieľom produkcie veľkého počtu identických rastlín. Jej aplikácia je v množení nových cenných genotypov, ktoré boli vytvorené klasickým šľachtením alebo geneticky modifikovaných genotypov. Je taktiež využívaná pre rýchle a masové množenie vegetatívne rozmnožovaných rastlín alebo rastlín, ktoré neprodukujú semená. Mikropropagácia je významnou súčasťou komerčného množenia mnohých druhov rastlín.

Zvýšený dopyt po drobnom ovocí vyvolal potrebu zakladania nových produkčných výsadiieb, pre založenie ktorých je potrebné veľké množstvo kvalitného sadbového materiálu. Práve pletivové kultúry sú vhodným nástrojom pre rýchle a ekonomicky výhodné množenie sadbového materiálu pri ovocných drevinách.

Mikropropagácia bola študovaná pri rozličných genotypoch rodu *Rubus* (Graham et al., 1997; Mezzetti et al., 1997; Palonen a Buszard, 1998; Gajdošová et al., 2006; Ružić a Lazić, 2006; Lazić a Ružić, 2007; Zawadska a Orlikowska, 2006; Wu et al., 2009; Dziedzic a Jagla, 2013). Mikropropagačným technikám za účelom regenerácie a reprodukcie druhov rodu *Vaccinium* sa venuje značná pozornosť v zahraničí (Marcotrigiano a McGlew, 1991; Popowich a Filipenya, 1997; Gonzales, 2000; Serres et al., 1994; Jaakola et al., 2001) avšak na Slovensku je tento spôsob množenia sadbového materiálu málo využívaný.

Výsledky spomínaných štúdií ukázali, že vývoj účinných a široko aplikovateľných regeneračných systémov je pri týchto druhoch zložitý pre ich veľkú genotypovú diverzitu a vysoko genotypovo špecifickú schopnosť regenerácie. Napriek dosiahnutým čiastkovým výsledkom je efektívna regenerácia a mikropropagácia pri niektorých odrodách stále obmedzená a vyžaduje optimalizáciu regeneračných a multiplikačných protokolov.

Údaje o mikropropagácii druhov rodu *Amelanchier* sú veľmi limitované a staršieho data. Mikropropagáciou muchovníkov sa v zahraničí zaoberal Bishop a Nelson (1980) a Pruski et al. (1990). Na Slovensku je muchovník prakticky neznámou ovocnou drevinou a údaje o jeho mikropropagácii nie sú dostupné.

In vitro kultivácia rastlín je ovplyvnená mnohými faktormi, ako sú genotyp, kultivačné médium, rastové regulátory, agar, typ explantátu a svetelné podmienky. Navyše, regenerácia je ovplyvnená vekom a fyziologickým stavom donorovej rastliny, čo robí regeneráciu z dospelých pletív ovocných drevín zvlášť obtiažnou. Z tohto dôvodu je potrebné sústrediť sa na vypracovanie účinných mikropropagačných protokolov hlavne pre nové produkčné odrody drobného ovocia, schopné rásť a poskytovať úrodu v našich klimatických podmienkach.

2. Ciele výskumu

Cieľom výskumu bolo vypracovať protokoly pre mikropropagáciu vybraných druhov a odrôd drobného ovocia, aby tieto boli k dispozícii pre potreby množiteľskej praxe.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

3. Objekty experimentálneho štúdia

Vybrané odrody druhov:

Rubus fruticosus L. – ostružina černicová

Rubus idaeus L. – ostružina malinová

Vaccinium corymbosum L. – čučoriedka chocholíkatá

Vaccinium vitis-idaea L. – brusnica pravá

Amelanchier alnifolia var. *Cusickii* – muchovník jelšolistý

4. Použitá laboratórna technika

Pre riešenie úloh výskumu bola použitá existujúca laboratórna technika, ako aj niektoré prístroje objednané, dodané a už inštalované v rámci projektu AgroBioTech.

- autokláv STURDY SA-260 MA
- autokláv horizontálny (Laboklav 25-M) - zakúpený z projektu ABT
- analytické váhy (Sartorius)
- analytické váhy Kern – zakúpené z projektu ABT
- predvažovačky Unitwist (UniEquip)
- pH meter Consort (Scientific Instruments)
- laminárny box s HEPA filtrom UniFlow UVU700
- laminárny box Labcare clean air
- laminárny box Biohazard (BioII Advance 6) - zakúpený z projektu ABT
- lupy Binocular SMZ – 2T (Nikon); EZ4D (Leica); Stemi Dv4 (Zeiss)
- svetelný mikroskop NU2 Carl Zeiss
- fluorescenčný mikroskop Axioplan 2 (Zeiss)
- invertovaný mikroskop EC3 (Leica); TMS (Nikon)
- sušičky G100/250 (KBC), HS62A
- laboratórna sušička (Memmert) - zakúpená z projektu ABT
- zariadenie na demineralizovanú vodu AQUAL 29 (Merci)
- prístroj pre výrobu ultračistej vody (Simplicity UV) - zakúpený z projektu ABT
- chladničky, mrazničky (-20°C)
- kultivačné miestnosti s regulovanou teplotou a svetelným režimom

5. Pracovné postupy

- **Zber rastlinného materiálu** z dospelých jedincov. Odber materiálu, výhonkov s dormantnými axilárnymi a apikálnymi púčikmi, bol realizovaný v mesiacoch január – február 2014, 2015.
- **Sterilizácia rastlinného materiálu** (nodálnych segmentov nesúcich 1 púčik) v 70 % etanole - 2 min., 0,1% HgCl₂ - 6 min., následné premývanie v sterilnej destilovanej vode 3 x 15 min.
- **Založenie in vitro kultúr** - vysadenie vysterilizovaných explantátov na kultivačné médium. Zloženie kultivačného média zodpovedá kultivovanému rastlinnému druhu.
- **Iniciácia rastu výhonkov z púčikov** - na kultivačných médiách s rastovými látkami auxínmi a cytokinínmi.
- **Multiplikácia výhonkov** - opakovanou subkultiváciou výhonkov na médiách so zníženou koncentráciou cytokinínov.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

- **Zakoreňovanie výhonkov *in vitro*** - na médiách s auxínom IBA.

6. Výsledky a očakávané prínosy

Výsledkom výskumu sú vypracované protokoly pre mikropropagáciu druhov rodu *Vaccinium* (Príloha č.7), *Rubus* (Príloha č.8) a *Amelanchier* (Príloha č.9).

Merateľné ukazovatele výsledkov

HRICOVÁ, Andrea - GAJDOŠOVÁ, Alena - LIBIAKOVÁ, Gabriela. *In Vitro* shoot multiplication in *Vaccinium corymbosum* L. and *Rubus* spp. cultivars. In *Plant Biology Europe FESPB/EPSO 2014 Congress*, 22 - 26 June, 2014. Dublin, FESPB/EPSO, 2014, p. 321.

Podiel ABT– 50%

GAJDOŠOVÁ, Alena - LIBIAKOVÁ, Gabriela. Uplatnenie pletivových kultúr v klonálnom množení drevín. In Zborník referátov z vedeckej konferencie „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2014“ 18.9.2014, Vieska nad Žitavou, Arborétum Mlyňany SAV, s. 55-56.

Podiel ABT- 33%

LIBIAKOVÁ, Gabriela - SÚKENÍKOVÁ, Miroslava - MATÚŠOVÁ, Radoslava - GAJDOŠOVÁ, Alena. Adventitious shoot regeneration *in vitro* *Rubus fruticosus* L. In *Applied Natural Sciences 2013, The 4th International Scientific Conference*, Nový Smokovec, 2-4 October 2013. Trnava, University of SS. Cyril and Methodius, 2013, p. 108. ISBN 978-80-8105-501-0.

Podiel ABT – 33%

HUNKOVÁ, Júlia – LIBIAKOVÁ, Gabriela – GAJDOŠOVÁ, Alena. Optimalizácia podmienok pri zakladaní *in vitro* kultúr *Actinidia arguta* a *Vaccinium corymbosum* (zadané do tlače).

HUNKOVÁ, Júlia – ZÁUJECOVÁ, Marcela – LIBIAKOVÁ, Gabriela – GAJDOŠOVÁ, Alena. Mikropropagácia *Amelanchier alnifolia* var. *cusickii* (zadané do tlače).

7. Zoznam použitej literatúry

BISHOP, B.H. - NELSON, S.H. (1980). *Can. J. Plant. Sci.* 60(3), p. 883.

DZIEDZIC, E.- JAGLA, J. (2013). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, M. Lambardi, E. Aylin Ozudogru, S. M. Jain (Eds.), 994, ISBN: 978-1-62703-073-1, p. 149-160.

GAJDOŠOVÁ, A. - OSTROLUCKÁ, M.G. - LIBIAKOVÁ, G.- ONDRUŠKOVÁ, E. - ŠIMALA, D. (2006). *J Fruit Ornament Plant Res* 14, (Suppl.1.), 61-76.

GONZALEZ, M.V. - LOPEZ, M. - VALDES, A.E. - ORDAS, R.J. (2000). *Annals of Applied Biology* 137, 73-78.

GRAHAM, J. - IASI, L. - MILLAM, S. (1997). *Plant Cell Tissue Org Cult*, 48, 167-173.

JAAKOLA, L. - TOLVAREN, A. - LAINE, K. - WAITES, W.M. (2001). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30, 171-179.

LAZIĆ, T. – RUŽIĆ, D. (2007). *Genetika*, 39, 69-78.



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt spolufinancovaný zo zdrojov ES
Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“

-
- MEZZETTI, B. - SAVINI, G. - CARNEVALI, F. - MOTT, D. (1997). *Biologia Plantarum*, 39, 139 - 150.
- NOÉ, N. - BONINI, L. (1996). *Biologia Plantarum*, 38(1), 19 - 25.
- NOÉ, N. - ECCHER, T. (1994). *Physiologia Plantarum*, 91, 273 - 275.
- PALONEN, P. - BUSZARD, D. (1998). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 53, 213-216.
- POPOWICH, E. - FILIPENYA, A. (1997). *Russian Journal of Plant Physiology* 44, 104-107.
- PRUSKI, K. - NOWAK, J. - GRAINGER, G. (1990). *Plant. Cell. Tiss. Org.* 21(2), 103.
- RUŽIĆ, D. - LAZIĆ, T. (2006). "Berry plant quality and sustainable production", Book of Abstracts, COST 863, JM WG 2&3, Zagreb, Croatia, p. 21.
- SERRES, R. - McCOWN, B. - ZELDIN, E. (1994). *Plant Cell Reports*, 16, 641 - 646.
- ZAWADSKA, M. - ORLIKOWSKA, T. (2006). *J. Fruit Ornam Plant Res*, 14, 105-115.
- WU, J.H. - MILLER, S.A. - HALL, H.K. - MOONEY, P.A. (2009). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99,17-25.

_____ podpis _____

RNDr. Alena Gajdošová, CSc.

_____ podpis _____

RNDr. Gabriela Libiaková, CSc.

_____ podpis _____

Mgr. Júlia Hunková

- Príloha č. 7: Protokol pre mikropropagáciu vybraných odrôd druhov rodu *Vaccinium*
Príloha č. 8: Protokol pre mikropropagáciu vybraných odrôd druhov rodu *Rubus*
Príloha č. 9: Protokol pre mikropropagáciu druhu *Amelanchier alnifolia*

Práca bola riešená v rámci projektu Európskeho spoločenstva: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“, projekt číslo 26220220180.