

UTRZYMYWANIE ZDROWYCH GENOTYPÓW ZIEMNIAKA *in vitro*

Zofia Szwichtenberg, Danuta Sekrecka

Zakład Nasiennictwa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Boninie

Wstęp

W Instytucie Ziemniaka w Boninie (obecnie oddział IHAR), w 1981 roku powstała kolekcja genotypów ziemniaka *in vitro*. Stanowi ona główne źródło poszukiwanych cech wprowadzanych do nowych odmian, niezbędnych dla uzyskania postępu w hodowli. Jej zasoby wykorzystywane są również w badaniach genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych wspomagających hodowlę.

W ostatnich latach, przy utrzymującym się wysokim zagrożeniu chorobami wirusowymi ziemniaka i związanych z tym trudnościach w uzyskaniu kwalifikowanych sadzeniaków, wzrasta również znaczenie wykorzystywania zdrowych materiałów *in vitro* w cyklu hodowli zachowawczej. W zasadzie jest to jedyny sposób uzyskania zdrowych materiałów w hodowli zachowawczej dla wielu odmian ziemniaka. Korzystanie z banku genów umożliwi znaczne skrócenie cyklu hodowlanego (nawet o 2 lata).

Bank genotypów ziemniaka prowadzony *in vitro* pozwala na:

- utrzymywanie materiału całkowicie wolnego od porażenia ważnymi dla ziemniaka patogenami (wirusy, bakterie, w tym obiekty kwarantannowe),
- uzyskanie dużej liczby roślin potomnych z jednej rośliny matecznej w stosunkowo krótkim czasie, niezależnie od pory roku,
- wymianę materiału bez obawy o choroby kwarantannowe.

Materiał i metody

Źródłem roślin utrzymywanych *in vitro* są bulwy ziemniaka (3 dla każdego genotypu) przetestowane na obecność bakteriozy pierścieniowej, choroby kwarantannowej wywoływanej przez bakterię *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Dla uwolnienia od porażenia wirusami, rośliny z przebadanych bulw poddawane są termoterapii przez okres 4–6 tygodni w temperaturze 37/33°C – dzień/noc.

W 3–4 tygodniu termoterapii rośliny testowane są na obecność wirusa wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd), także obiektu kwarantannowego. Jedynie rośliny wolne od porażenia tym patogenem służą jako materiał do dalszej pracy.

Z pąków szczytowych i bocznych roślin pobierane są merystemy wielkości 0,1–0,2 mm i umieszczane w probówkach na pożywce Murashige-Skooga (1962) z agarem lub phytagelem oraz dodatkiem sacharozy (30 g/l), gibereliny (0,1 mg/l) i kinetyny (0,04 mg/l) na okres od 4 do 18 tygodni w komorach wzrostowych, w warunkach 22°C, przy oświetleniu ok. 40 W·m⁻².

Roślinki, które wyrosły z merystemów są kontrolowane testem ELISA dwu lub trzykrotnie na obecność wirusów X, S, M, Y oraz liściszowju. Następnie rośliny przenoszone są na świeżą pożywkę MS z dodatkiem agaru lub phytagełu, sacharozy (60 g/l), witamin i kazeiny oraz kwasu absycynowego (1,25 mg/l). Dzięki zastosowaniu takiej pożywki ograniczono częstotliwość odnawiania kultur *in vitro*. Obecnie wynosi ona przeciętnie dwa lata, a niektóre genotypy można utrzymać na tej samej pożywce nawet przez 5 lat.

Rośliny w banku genów ziemniaka *in vitro* utrzymywane są przy małym natężeniu światła (ok. 4 W·m⁻²) i w niskiej temperaturze (6–10°C). Z każdego genotypu przechowywanych jest do 50 roślin z kilku klonów, tj. pochodzących z kilku bulw wyjściowych.

Trwałość genotypów ziemniaka przechowywanych przez dłuższy czas w banku (5–6 lat) jest kontrolowana poprzez wysadzanie roślinek w szklarni a na uzyskanych z nich bulw w polu, przeprowadzane są dokładne obserwacje roślin i identyfikacje poszczególnych cech z opisami w katalogach.

Wyniki i dyskusja

Zasoby banku *in vitro* (1981–1998)

Podjęte w roku 1981 prace nad tworzeniem kolekcji genotypów ziemniaka w formie *in vitro*, w pierwszym dziesięcioleciu były ze względu na

skromne zaplecze techniczne prowadzone na małą skalę. Znaczący udział stanowiły materiały hodowlane, które usuwano z banku w momencie gdy dany ród nie został wpisany do rejestru. Z wprowadzonych w latach 1981–1991 do banku genów 305 genotypów, w roku 1992 pozostało 205 form.

Rok 1992 był znaczącym dla rozwoju banku *in vitro*. Przede wszystkim oddano do użytku nowoczesne laboratorium umożliwiające znaczne poszerzenie zakresu prac, a ponadto zmieniono strategię wyboru genotypów wprowadzanych do banku. W pierwszej kolejności umieszczano w banku najbardziej zdegenerowane w kolekcji polowej stare odmiany zapobiegając w ten sposób ich utracie a jednocześnie ograniczono liczbę rodów hodowlanych sugerując hodowcom jedynie wybór najbardziej perspektywicznych form.

Warto podkreślić, że w przypadku ziemniaka, wprowadzenie jednego genotypu do banku jest dość praco- i materiałochłonne, a zatem kosztowne. Hodowcy obciążani są kosztami z tego tytułu a wprowadzenie i utrzymywanie odmian w banku jest w znacznej mierze dofinansowywane przez MRiGŻ w ramach tematów celowych z Funduszu Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej.

Od roku 1991 do chwili obecnej włączono do banku 906 genotypów z czego dominującą część stanowiły odmiany. Wprowadzanie i zasoby banku przedstawiono w tabelach 1 i 2. Ogółem w formie *in vitro* wg stanu na 31.08.1998 r. znajduje się 1040 genotypów, w tym 955 odmian. W banku utrzymywane są wszystkie polskie odmiany ziemniaka wpisane do rejestru w okresie powojennym (25% zasobów), a z odmian zagranicznych największy udział mają odmiany niemieckie (27% zasobów) i holenderskie (17% zasobów).

Tabela 1; Table 1

Wykaz genotypów wprowadzonych do banku *in vitro*
(w okresach 5-letnich)

Enlargement of gene bank resources (*in vitro*) in 5 year periods

Lata Years	Liczba wprowadzonych genotypów Number of introduced genotypes	Liczba genotypów w banku Number of genotypes in bank
1981–85	95	88
1986–90	156	261
1991–95	501	635
1996	130	765
1997	140	905
1998 (31.08.)	135	1040 (w tym 955– odmiany) (955 cultivars including)

Tabela 2; Table 2

Zasoby banku genów *in vitro* (stan na 31.08.1998 r.)Accessions to gene bank according
to quantity and origin country (31.08.1998)

Kraj pochodzenia Country of origin	Liczba odmian, rodów Number of cultivars clones		Kraj pochodzenia Country of origin	Liczba odmian, rodów Number of cultivars clones	
Niemcy; Germany	281	–	Indie; India	10	–
Polska; Poland	172	46	Kanada; Canada	7	–
Holandia; Nether Lands	180	–	Finlandia; Finland	6	–
Rosja; Russia	73	2	Szwecja; Sweden	6	–
Anglia; UK	41	–	Bułgaria; Bulgaria	4	–
USA	36	20	Jugosławia; Yugoslavia	3	–
Czechosłowacja; Czechoslovakia	38	–	Hiszpania; Spain	2	–
Francja; France	16	–	Norwegia; Norway	2	–
Austria	16	–	Dania; Denmark	2	–
Węgry; Hungary	13	–	Kuba; Cuba	1	–
Rumunia; Romania	12	–	Peru	–	15
Meksyk; Mexico	11	2	Inne; Other	13	–
Japonia; Japan	10	–	Razem; Total	955	85

Szczegółowy, zaktualizowany wykaz odmian jest corocznie publikowany w jednym z numerów kwartalnika Ziemiak Polski, a ponadto upowszechniany w różnej formie (katalogi, postery itp.).

Znaczna liczba roślin (ok. 50) utrzymywana w banku dla jednego genotypu, szczególnie odmian polskich, ale również niemieckich czy holenderskich rejestrowanych ostatnio w Polsce, jest uzasadniona możliwością łatwiejszego realizowania zamówień firm hodowlanych lub nasiennych na przygotowanie zdrowego materiału dla produkcji nasiennej. Natomiast utrzymywanie potomstwa kilku bulw matecznych, z jednej strony zmniejsza ryzyko rozmnożenia dużej partii materiału wykazującej jakieś wady, np. porażenie patogenem, z drugiej strony może również stwarzać ryzyko niepełnej jednorodności materiału, jeśli bulwy mateczne nie były jednorodne. Takie przypadki mogą się sporadycznie zdarzać, jednakże zapobiega się im skutecznie poprzez okresową kontrolę trwałości genotypów po dłuższym okresie przechowywania w banku.

Jednocześnie, należy podkreślić fakt, że zarówno na podstawie obserwacji własnych jak i danych z literatury [ROCA i in. 1979] wynika, że prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji somatycznych przy utrzymywaniu roślin ziemniaka *in vitro* nie jest większe niż przy tradycyjnym rozmnażaniu przez bulwy w polu.

Badania na rzecz banku *in vitro*

Poza pracami związanymi bezpośrednio z wprowadzaniem genotypów do banku, w oddziale IHAR w Boninie wykonywane są od wielu lat badania dotyczące technik utrzymywania kultur *in vitro*. Cele badań były adekwatne do potrzeb w poszczególnych okresach, a także do poziomu ogólnej wiedzy na ten temat. Stąd też jako jedne z pierwszych prowadzone były badania dotyczące uzyskania materiałów wolnych od wirusów, np. określano wielkość wycinków tkanki merystematycznej, warunki termoterapii itp. [ZAKLUKIEWICZ 1983]. Obecnie, prace badawcze są ukierunkowane głównie na usprawnienie utrzymywania materiałów w banku, w tym np. modyfikacje składu pożywek pozwalające na wydłużenie okresów między kolejnym odnawianiem materiału [ZAKLUKIEWICZ, SEKRECKA 1994], lub zwiększenie współczynnika rozmnażania roślin na etapie *in vitro* dla tzw. trudnych, to jest słabiej rozwijających się genotypów [SEKRECKA, TRENDAK 1997]. Podejmowane są dalsze badania nad doskonaleniem metod kontroli zdrowotności przechowywanego materiału.

Wykorzystanie banku

Aktualne wykorzystanie posiadanych w formie *in vitro* genotypów ziemniaka zostało omówione szczegółowo w odrębnej publikacji [SEKRECKA, SZWICHTENBERG 1998]. Na podkreślenie zasługuje przede wszystkim praktyczne wykorzystanie zasobów banku w produkcji nasiennej na jej pierwszym etapie tj. w hodowli zachowawczej [ZAKLUKIEWICZ i in. 1995]. Obecnie wszystkie jednostki prowadzące hodowlę zachowawczą w kraju korzystają z wyjściowych materiałów *in vitro*.

Liczba odmian zamawianych corocznie jest zmienna, jednakże można stwierdzić, że tylko w odniesieniu do nielicznych odmian będących obecnie w rejestrze, nie użyto na etapie hodowli zachowawczej materiałów pochodzących z banku w Boninie.

Od roku 1997 Oddział IHAR w Boninie bierze udział w realizacji międzynarodowego programu koordynowanego przez UE, którego celem jest utworzenie katalogu danych odnośnie wszystkich genotypów znajdujących się w bankach państw członkowskich. Należy mieć nadzieję, że udział w realizacji tego programu ułatwi kontakt z innymi placówkami oraz zwiększy wielostronną wymianę materiałów.

Wnioski

1. Utworzony w 1981 roku w Boninie bank genotypów ziemniaka *in vitro* jest jedyną w kraju kolekcją całkowicie zdrowych tetraploidów ziemniaka.

2. Aktualnie w banku ziemniaka *in vitro* znajduje się 1040 genotypów, w tym 955 odmian.
3. W formie *in vitro* utrzymywane są wszystkie polskie odmiany ziemniaka wpisane do rejestru w okresie powojennym, a z odmian zagranicznych największy udział mają odmiany niemieckie (27% zasobów) i holenderskie (17%).
4. W banku genotypów ziemniaka utrzymywane są materiały całkowicie wolne od porażenia patogenami (wirusy, bakterie).
5. Dzięki odpowiedniemu składowi pożywki niektóre genotypy przechowywane są bez konieczności odnawiania materiału nawet przez 5 lat.
6. Brak alternatywnych możliwości pozyskania przez hodowlę zachowawczą zdrowych materiałów wyjściowych dla wielu odmian ziemniaka, przyczyniło się w ostatnich latach do wzrostu znaczenia zasobów genowych w formie *in vitro*.
7. Uzyskanie dowolnej liczby roślin potomnych z jednej rośliny matecznej jest możliwe w stosunkowo krótkim czasie i niezależnie od pory roku.

Literatura

- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- ROCA W.M., ESPINOZA N.O., ROCA M.R., BRYAN J.E. 1979. *A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes*. *Am. Potato J.* 55: 691–701.
- SEKRECKA D., SZWICHTENBERG Z. 1998. *Wykorzystanie genotypów ziemniaka utrzymywanych in vitro*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 463: 619–625.
- SEKRECKA D., TREDAK E. 1997. *Wpływ składu pożywki na wzrost i rozwój roślin in vitro ziemniaka*. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie* 318, Sesja naukowa, 50: 145–149.
- ZAKLUKIEWICZ K. 1983. *The effect of thermotherapy, meristem size and medium on the obtainment of potato plants and their healthiness*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 291: 379–383.
- ZAKLUKIEWICZ K.E., SEKRECKA D. 1994. *Kultury in vitro ziemniaka formą przechowywania genotypów i ich potencjalne możliwości dostarczania materiału do hodowli zachowawczej*. *Prace Ogródu Botan. PAN* 5/6: 347–352.
- ZAKLUKIEWICZ K., TURSKA E., SEKRECKA D., JĘDRZEJOWSKA E. 1995. *Technologia mikrorozmnażania roślin ziemniaka, produkcja minibulw oraz ich wykorzystanie w hodowli i nasiennictwie*. *Inst. wdrożeniowa* 2: 40 ss.

Słowa kluczowe: ziemniak, *in vitro*, bank genotypów, rośliny wolne od patogenów

Streszczenie

Bank *in vitro* roślin odmian i szczególnie cennych rodów hodowlanych ziemniaka, prowadzony jest w Instytucie Ziemniaka w Boninie (obecnie Oddział IHAR) od 1981 roku.

W pierwszych latach istnienia banku tempo powiększania jego zasobów było powolne. Oddanie do użytku laboratorium przeznaczonego do prac *in vitro* (izolowanie, mikrorozmnażanie) i konieczność przeniesienia silnie zdegenerowanej kolekcji polowej do banku *in vitro* znacznie przyspieszyły prace.

Materiał wyjściowy dla uzyskiwania roślin *in vitro* wolnych od patogenów stanowią bulwy z rozmnożeń polowych, testowane na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej. Rośliny z przebadanych bulw poddawane są termoterapii (37°/33°C dzień/noc) przez okres 4–6 tygodni. W 3–4 tygodniu termoterapii rośliny kontrolowane są pod względem porażenia wiroidem wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd). Po okresie termoterapii z pąków kątowych izolowane są merystemy, z których po 4–18 tygodniach wzrostu na pożywce MS uzyskuje się roślinki. Przed wprowadzeniem do banku roślinki są 2–3 krotnie badane testem ELISA na obecność wirusów X, S, M, Y i liściozwoju. Tak przeprowadzane testy dają pewność całkowitej zdrowotności materiału. Rośliny umieszczane są na pożywce z dodatkiem kwasu absycynowego i przechowywane w banku bez konieczności odnawiania przeciętnie przez 2,5 roku (nawet do 5 lat).

Rośliny *in vitro* wolne od patogenów stanowią materiał wyjściowy nie tylko dla hodowli twórczej i zachowawczej, ale także dla prac badawczych prowadzonych przez placówki naukowe w kraju i za granicą.

Bank genotypów *in vitro* w Boninie jest jedyną kolekcją całkowicie zdrowych tetraploidów ziemniaka w Polsce i obejmuje obecnie 1040 genotypów, w tym 955 odmian.

W zasobach banku znajdują się wszystkie polskie odmiany zrejonizowane w okresie powojennym (25% zasobów), a z odmian zagranicznych największy udział mają odmiany niemieckie (27%) i holenderskie (17%).

In vitro MAINTENANCE OF HEALTHY POTATO GENOTYPES

Zofia Szwichtenberg, Danuta Sekrecka

Department of Seed Production,
Plant Breeding and Acclimatization Institute, Division Bonin

Key words: potato, *in vitro*, bank of genotypes, pathogen-free plantlets

Summary

The germplasm of potato cultivars and particularly important breeding clones are maintained in Plant Breeding and Acclimatization Institute (formerly Potato Research Institute) in Bonin since 1981. The rate of stock enlargement was rather slow in the first years of collection activity. The process has been accelerated when it became necessary to reshape severely degenerated field collection into *in vitro* form.

The tubers grown in the field are an initial source of *in vitro* pathogen-free plantlets. Tubers are examined at this stage for the absence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Subsequently, the plants are exposed to thermotherapy (37°/33°C day/night) for 4–6 weeks. The absence of PSTVd in plants is examined in 3–4 week of thermotherapy procedure. Finally, lateral buds are excised and meristematic tissues regenerated for 4–18 weeks on MS medium.

All regenerated plants are tested 2 or 3 times for the presence of PVX, PVY, PVS, PVM and PLRV by ELISA method. This procedure proves the absence of pathogens in plant tissues. Examined plantlets are placed on the medium with abscisic acid and could be stored for 2.5 years (even 5 years) without need of rejuvenation.

The collection contains 1040 genotypes covering 955 cultivars. The most numerous are German cultivars (27% of resources), all Polish cultivars registered after the second world war (25%) and Dutch cultivars (17%). Remaining cultivars are originated from 20 other countries.

Dr Zofia Szwichtenberg

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Oddział Bonin

76-009 BONIN

e-mail: iziem@man.koszalin.pl