

ZASOBY BANKU GENÓW ZIEMNIAKA *IN VITRO* I ICH WYKORZYSTANIE W PRAKTYCE

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska
IHAR – PIB, Pracownia Zasobów Genowych i Kultur *in vitro* w Boninie
e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

Ziemniak (*Solanum tuberosum*) rozmnaża się wegetatywnie, dlatego też zgromadzone zasoby genowe powinny być utrzymywane w postaci bulw (kolekcja polowa) lub roślin *in vitro* (bank genów). Kolekcje polowe są kosztowne w utrzymaniu, a jednocześnie narażone na niekorzystne czynniki pogodowe oraz inwazję chorób i szkodników. Obecnie 99% zasobów genowych ziemniaka utrzymywanych jest w formie roślin *in vitro*. Kolekcja w Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka IHAR – PIB w Boninie liczy ponad 1600 form, w tym 1520 to odmiany z 23 krajów świata (fot. 1).

Kolekcję podstawową tworzą polskie odmiany, które stanowią ponad 20% zasobów. W postaci roślin *in vitro* są utrzymywane prawie wszystkie odmiany wpisane do rejestru po 1945 r. Najstarszą polską odmianą w banku jest Świteż z 1902 r., która była popularna jeszcze w latach 60. XX w. dzięki dobremu przechowywaniu się i dobremu smakowi (fot. 2). Co roku do banku wprowadza się nowe odmiany wpisane do rejestru, np. w 2012 były to: Boryna, Ignacy, Igor, Jurek, Kaszub i Oberon.

Dużym atutem banku *in vitro* jest zdrowotność zgromadzonych zasobów genowych. Wszystkie genotypy są wolne od powszechnie występujących wirusów ziemniaka: X, S, M, Y i liściozwoju oraz od bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) wywołującej bakteriozę pierścieniową, *Ralstonia solanacea* (sprawcy śluzaka) i wiroidu wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd).



Fot. 1. Bank genów ziemniaka *in vitro* w Boninie
(autorką wszystkich zdjęć jest D. Sekrecka)

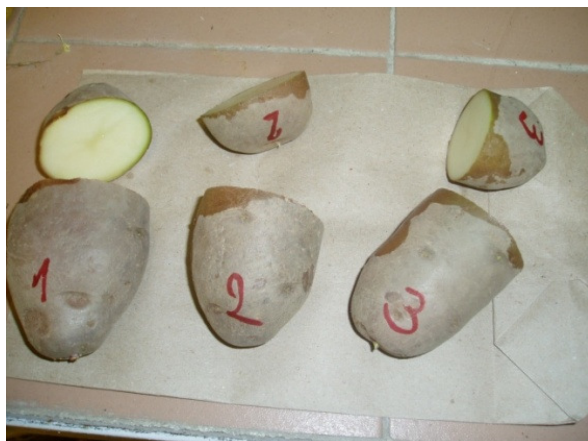


Fot. 2. Odmiana Świteż w banku genów

Wprowadzanie nowych tetraploidalnych genotypów ziemniaka do banku genów *in vitro*

Materiałem wyjściowym do wprowadzenia genotypu do banku są bulwy nowych odmian i rodów perspektywicznych uzyskane od hodowcy. Część stolonowa każdej bulwy jest badana na obecność bakterii *Cms* i *R. solanacea*. Testy wykonuje się metodą pośred-

niej immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał poli- i monoklonalnych. Tylko materiał wolny od ww. patogenów poddawany jest termoterapii (fot. 3 i 4). Przez 4-8 tygodni rośliny rosną w fitotronie w temperaturze 35-37°C i oświetleniu ok. 5000 luksów. W 3. tygodniu wzrostu są testowane na obecność PSTVd – testem PCR oraz wirusów ziemniaka – testem ELISA. Od 4. tygodnia z pąków kątowych i bocznych izoluje się merystemy. Odkazony chloraminą materiał roślinny jest umieszczany w kropli sterylnej wody redestylowanej na płytce Petriego, a następnie pod mikroskopem, za pomocą igły preparacyjnej i skalpela, izolowane są merystemy. Eksplantaty wykłada się na pożywki z dodatkiem cytokiny i umieszcza w fitotronie, w temperaturze 16-20°C, przy dobowym cyklu dzień/noc 16/8 godz. i natężeniu światła ok. 3000 luksów. Po 2-6 miesiącach z merystemów otrzymuje się rośliny *in vitro*, wyrównane fenotypowo i genetycznie stabilne.



Fot. 3. Część stolonowa materiału wyjściowego przygotowana do badania na *C. michiganensis ssp. sepedonicus*

Bardzo istotnym aspektem wykorzystania tej metody jest poprawa zdrowotności roślin. Dzięki kulturom merystemów uzyskuje się materiał roślinny wolny od patogenów, a zwłaszcza od wirusów. Wykazano, że merystem wierzchołkowy pędu nie zawiera wirusów bądź ma ich niewiele. Termoterapia, tj. traktowanie materiału roślinnego podwyższoną temperaturą, dodatkowo nasila proces odwirusowania rodów i odmian. Przed umieszczeniem genotypu w banku genów jego zdrowotność jest sprawdzana za pomocą testu ELISA. Wykonuje się co najmniej 3-

-krotne badania na obecność wirusów A, X, S, M, Y i liściozwoju.



Fot. 4. Szafa do termoterapii (fitotron) z roślinami gotowymi do izolowania merystemów

Długoterminowe przechowywanie zdrowych genotypów ziemniaka w banku *in vitro*

Zgromadzone w banku genotypy są utrzymywane w postaci roślin *in vitro* w warunkach wolnego wzrostu. Polega to na zaspokojeniu minimalnych potrzeb kultur roślinnych dla wzrostu i rozwoju, tak aby ograniczyć proces ich starzenia się. W fitotronie, gdzie utrzymywane są zasoby, temperatura wynosi 8-10°C, a natężenie światła – do 500 luksów. Pożywka, na której rosną kultury *in vitro*, zawiera inhibitory wzrostu (kwas abscysynowy) albo związki o charakterze osmotocum (np. mannitol), które dodatkowo spowalniają wzrost. Takie warunki pozwalają na wydłużenie czasu przechowywania kultur *in vitro* bez konieczności częstego ich pasażowania. W zależności od genotypu rośliny *in vitro* są utrzymywane na tej samej pożywce od roku do 6 lat (tab. 1).

Corocznie jest odnawianych ok. 30% kultur roślinnych genotypów wcześniej wprowadzonych do banku. Odnawianie polega na przeszczepianiu jednowęzłowych odcinków na standardową pożywkę Murashige-Skooga (1962) i po uzyskaniu silnych, dobrze ukończonych roślin ponownym ich pasażowaniu na pożywkę do długoterminowego przechowywania (tzw. pożywka bankowa). Z każdego genotypu przechowywanych jest po 30-40 roślin *in vitro*. Tak duża liczba jest szczególnie potrzebna w wypadku genotypów często pobieranych z banku (fot. 5).



Fot. 5. Długoterminowe przechowywanie odmian w banku

Wszystkie genotypy utrzymywane w banku genów są sukcesywnie poddawane identyfikacji trwałości genetycznej i odmianowej. W warunkach szklarniowych i polowych każda forma jest waloryzowana raz na 5-6 lat. Rośliny *in vitro* wybranych genotypów (ok. 200 rocznie) wysadza się w szklarni, a uzyskane minibulwy w roku następnym w polu. Dane z obserwacji roślin wyrosłych ze zdrowych bulw są porównywane z opisami otrzymanymi od hodowców (ulotki, katalogi).

Tabela 1

Okresy przechowywania genotypów bez konieczności pasażowania (kolekcja polskich odmian ziemniaka)

Okres przechowywania (lata)	Liczba genotypów	Procent
1	8	3,1
2	10	3,9
3	81	32,0
4	82	32,3
5	24	24,4
6	11	4,3
Ogółem	254	100,0

Wykorzystanie zasobów genowych ziemniaka *in vitro* w praktyce

Głównym zadaniem banku genów jest zachowanie różnorodności biologicznej oraz udostępnianie zasobów genowych hodowcom, naukowcom i rolnikom.

Genotypy są utrzymywane w kontrolowanych warunkach, w sterylnym środowisku, więc wpływ niekorzystnych warunków ze-

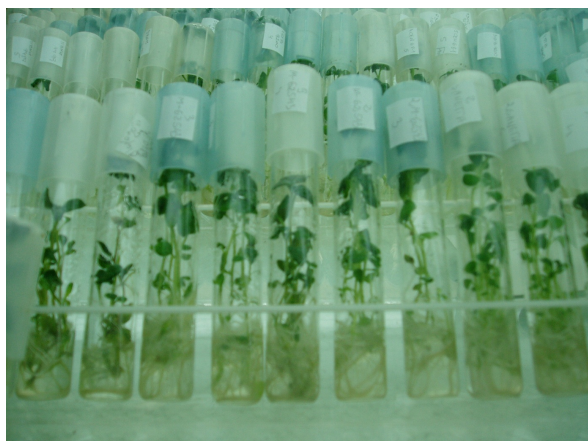
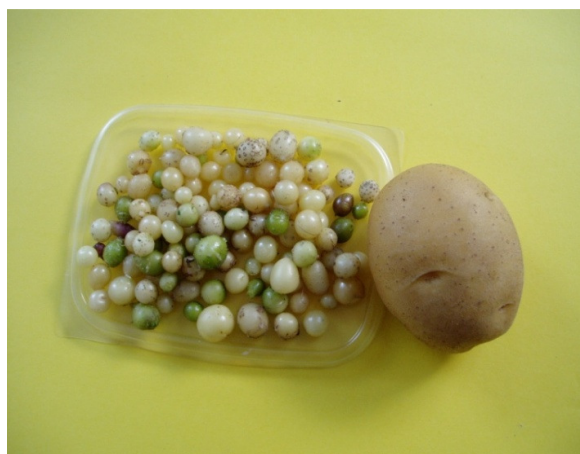
wewnętrznych jest wyeliminowany. Mikrorozmnażanie roślin *in vitro* przebiega w warunkach laboratoryjnych, wobec czego nie istnieje obawa o zainfekowanie ich patogenami (fot. 6).



Fot. 6. Mikrorozmnażanie roślin *in vitro* w sterylnych warunkach

Co roku z banku genów ziemniaka *in vitro* pobiera się pojedyncze rośliny z zamawianego genotypu, z których jest przygotowywany materiał genetyczny w formie roślin *in vitro*, mikrobulw i minibulw. Jest on następnie przekazywany placówkom hodowlanym i naukowym, a tam wykorzystuje się go w hodowli oraz badaniach genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych wspomagających hodowlę.

Każdy genotyp przed przekazaniem go hodowli jest dodatkowo testowany w Centralnym Laboratorium GIORiN na obecność bakterii *Cms* oraz *Ralstonia*. Tylko zdrowy materiał genetyczny, z wydanym przez GIORiN paszportem, trafia do dalszego mikrorozmnażania. Polskie hodowle prowadzą mikrorozmnażanie na dużą skalę z wyjściowego materiału otrzymanego z banku w Boninie. Wykorzystując technikę mikrorozmnażania można – poza gwarancją dobrej zdrowotności – stosunkowo szybko dostosować podaż sadzeńiaków danej odmiany do zmieniającego się popytu. Zastosowanie mikrorozmnażania jako elementu nowoczesnego nasiennictwa ma szczególne znaczenie w wypadku hodowli zachowawczej odmian mniej odpornych na choroby wirusowe, jeśli jednocześnie istnieje na nie duże zapotrzebowanie (fot. 7-9).

Fot. 7. Rośliny *in vitro*

Fot. 8. Mikrobulwy na tle sadzeniaka z hodowli tradycyjnej

Odmiany zagraniczne są mniej odporne na wirusy niż polskie i głównie dlatego w wielu krajach świata techniki mikrorozmnażania i produkcji minibulw upowszechniły się znacznie wcześniej niż w Polsce. U nas na większą skalę rozmnażanie *in vitro* rozpoczęto w drugiej połowie lat 80. XX w. i teraz

już wszystkie jednostki hodowlane korzystają z zasobów genowych zgromadzonych w banku genów w Boninie. W latach 2004-2012 ponad 90% będących w rejestrze odmian ziemniaka rozmnażano z użyciem materiałów pochodzących z banku *in vitro* (tab. 2).



Fot. 9. Minibulwy posortowane wg wielkości

Z roku na rok coraz bardziej upowszechnia się zasada rozpoczynania hodowli i prowadzenia badań na bazie roślin *in vitro*. Również wzrost popularności upraw ekologicznych przyczynia się do zainteresowania starymi odmianami ziemniaka zgromadzonymi w banku. Odmiany stare, z racji tego, że powstały w warunkach uprawy zbliżonych do tych, jakie dzisiaj są propagowane w rolnictwie ekologicznym, mogą być szczególnie przydatne do uprawy w tym systemie.

Tabela 2

Liczba prób przygotowanych i przekazanych w latach 2004-2012 z banku genów ziemniaka *in vitro* w Boninie podmiotom zewnętrznym

Rok	Liczba genotypów	Liczba przekazanych prób (sztuk) w formie		
		roślin <i>in vitro</i>	minibulw	mikrobulw
2004	291	16 500	-	-
2005	232	27 000	10 000	-
2006	228	17 500	9 000	-
2007	141	20 300	40 000	100
2008	218	88 500	11 000	400
2009	140	17 000	10 000	2 350
2010	220	27 460	23 380	5 520
2011	303	33 210	17 620	6 180
2012	277	32 030	15 390	7 740
Razem	2050	279 500	136 390	22 290

Podsumowanie

1. Bank genów *in vitro* w Boninie jest jedyną w kraju kolekcją zdrowych form tetraploidalnych ziemniaka.
2. Zgromadzony zróżnicowany materiał genetyczny ziemniaka stanowi źródło do tworzenia nowych odmian.

3. Brak innych możliwości pozyskania przez hodowlę i naukę zdrowych genotypów ziemniaka przyczyniło się do wzrostu znaczenia zasobów genowych w formie *in vitro*

Literatura

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – Phys. Plant. 15: 473-497.