



Regeneracja *in vitro* pędów truskawki źródłem wariantów somaklonalnych odpornych na wercyciliozę?

Iwona Sowik, Danuta Wawrzyńczak, Lech Michalczuk
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

In vitro shoot regeneration of strawberry as the source of somaclonal variants resistant to verticillium wilt?

Summary

Somaclonal variants of strawberry resistant to verticillium wilt were selected by cocultivation of shoots of various cultivars obtained by both micropropagation and regeneration from a callus with a homogenate of 3-week-old liquid culture of mixed isolates of *Verticillium dahliae*.

There was a large variation in the resistance to the pathogen within a population of both micropropagated and regenerated from the callus shoots. After 70 days of cocultivation most of the shoots of susceptible cultivars were heavily damaged or dead, but there were some individuals that survived in a relatively good health. Those variants were transplanted on a new Boxus's medium supplemented with 2 mg/l of benomyl to eliminate pathogen and their resistance to verticillium wilt is now tested.

Key words:

strawberry, *Verticillium dahliae*, resistance, *in vitro* selection.

Adres do korespondencji

Iwona Sowik,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

1 (52) 131-133 2001

1. Wstęp

Wercycilioza występuje powszechnie w większości rejonów uprawy truskawek na świecie, a w niektórych uważana jest za najgroźniejszą chorobę grzybową. Powoduje ona zahamowanie wzrostu, więdnienie i stopniowe zamieranie truskawek. Sprawcą wercyciliozy truskawek w Polsce jest mikrosklerocjalna forma grzy-

ba – *Verticillium dahliae* (1). Tradycyjne metody ochrony są drogie i często zawodne. Uważa się, że zdecydowane zmniejszenie zagrożenia truskawek można osiągnąć jedynie dzięki odmianom odpornym. Rozwój nauk biologicznych znacznie poszerzył możliwości manipulowania materiałem genetycznym, np. poprzez wykorzystanie zmienności somaklonalnej i selekcję prowadzoną w kulturach *in vitro* (2). Zmienność tego typu występuje we wszystkich kulturach roślinnych *in vitro*, aczkolwiek częstotliwość jej występowania jest większa przy regeneracji roślin z odróżnicowanej tkanki (kalus) niż przy bezpośredniej organogenezie z organów i tkanek (3). Poprzez selekcję wariantów somaklonalnych uzyskano rośliny odporne na porażenie przez *Alternaria alternata* (4), *Fusarium oxysporum* (5) i *Phytophthora cactorum* (6). Do selekcji wariantów odpornych na choroby grzybowe jest zazwyczaj stosowana toksyna lub filtryaty grzybni. W prezentowanej pracy czynnikiem selekcyjnym był natomiast homogenat grzybni *Verticillium dahliae*.

2. Materiał i metody

Do selekcji użyto kultury pędowe truskawki (*Fragaria x ananasa* Duch.) odmian Elsanta, Kaster i klonu hodowlanego 1015 o dużej wrażliwości na werciliozę. Kontrolę stanowiła odmiana Senga Sengana, która w warunkach polowych jest odporna. Pędy namnażano *in vitro* na pożywce wg Boxusa z dodatkiem IBA (0,5 mg/l), BA (0,5 mg/l) i GA₃ (0,1 mg/l). Doświadczenie prowadzono na nieukorzenionych, mikro-rozmnażanych pędach oraz na pędach zregenerowanych z tkanki kalusowej. Kalus uzyskiwano z eksplantatów liściowych na pożywce Murashige-Skoog'a z dodatkiem 1,5 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA oraz 500 mg/l hydrolizatu kazeiny. Regeneracja pędów zachodziła po 1-2 pasażach kalusa na tej samej pożywce. Zregenerowane pędy Elsanty, Kastera i klonu 1015 oraz mikro-rozmnażane pędy Elsanty, Kastera, klonu 1015 i Sengi Sengany przenoszono na pożywkę stałą wg Boxusa bez regulatorów wzrostu, na powierzchnię której наносzono homogenat 3-tygodniowej płynnej kultury mieszaniny izolatów *Verticillium dahliae*. Grzybnię homogenizowano bezpośrednio w pożywce na której rosła (2% Malt Extract). Stopień porażenia pędów oceniano po 22, 29, 36, 50, 60, 70 dniach według 6-stopniowej skali: 0 – rośliny zielone, 2 – ok. 25% porażonych liści, 3 – ok. 50% porażonych liści, 4 – ok. 75% porażonych liści, 5 – ok. 100% porażonych liści.

3. Wyniki

Grzyb *Verticillium dahliae* przygotowany w postaci homogenatu grzybni powodował zahamowanie wzrostu i rozwoju pędów wszystkich badanych odmian, aczkolwiek nasilenie tego procesu było zróżnicowane. Generalnie wyższą wrażliwość na działanie homogenatu wykazywały pędy zregenerowane z kalusa niż pędy mikro-roz-

mnażane. Pierwsze objawy uszkodzenia obserwowano już po 22 dniach na wszystkich odmianach wrażliwych, podczas gdy na Sendze Senganie pierwsze objawy wystąpiły tydzień później (tab. 1). Po 70 dniach traktowania homogenatem grzybni większość blaszek liściowych odmian Elsanta i Kaster była uszkodzona (stopień porażenia 4,8 i 4,4 u pędów regenerowanych z kalusa oraz 3,1 i 2,4 u pędów mikrorozmnażanych). Nieznacznie bardziej odporne były pędy klonu 1015, natomiast pędy Sengi Sengany porażone były tylko w niewielkim stopniu (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ homogenatu *Verticillium dahliae* na porażenie pędów truskawki w warunkach *in vitro*

Genotyp	Stopień porażenia pędów (wg 6-stopniowej skali)					
	Czas kokultury z patogenem (dni)					
	22	29	36	50	60	70
Elsanta R*	0,3	1,3	2,5	3,7	4,4	4,8
Elsanta M*	0,1	0,7	1,1	1,1	1,8	3,1
Kaster R	0,7	2,7	3,8	3,8	4,1	4,4
Kaster M	0,2	0,7	1,0	1,9	1,4	2,4
1015 R	0,1	0,6	1,6	1,6	2,3	3,1
1015 M	0,1	0,2	0,4	0,5	1,2	1,7
S. Sengana M	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4

R* – regeneranty

M* – mikrorozmnażane pędy

W obrębie populacji pędów badanych odmian obserwowano znaczne zróżnicowanie osobnicze odporności na porażenie przez *Verticillium dahliae*. Po siedemdziesięciu dniach kokultury z grzybem większość pędów była silnie porażona i zamierała, jednakże w każdej odmianie zachowały się osobniki, które zniosły presję patogena z nieznacznymi tylko uszkodzeniami. Odporne osobniki występowały zarówno w populacji pędów uzyskanych przez mikrorozmnażanie jak i zregenerowanych z kalusa. Osobniki wykazujące odporność poddano powtórnej selekcji w sposób opisany. Te, które przetrwały przeniesiono na pożywkę Boxusa z dodatkiem 2 mg/l benomyly w celu eliminacji patogena i namnożono *in vitro*.

Literatura

1. Leski B., (1974), Rocznik Nauk Rolniczych, Ser. E, 4, 253-269.
2. Michalik, B., (1995), Materiały Ogólnopolskiego Zjazdu Hodowców Roślin Ogrodniczych, ISK Skiernewice, cz. I, 38-44.
3. Skirvin R.M., Janick J., (1976), J. Am. Soc. Hort. Sci., 101, 282-290.
4. Takahashi, H., Matsumo, T., Takai, T., (1993), J. Jap. Soc. Hort. Sci., 61, 821-826.
5. Toyoda, H., Horikoshi, K., Yamano, Y., Duchi, S., (1991), Plant Cell Rep., 10, 167-170.
6. Battistini, C., Rosati, P., Luby, J. J., (1991), Ed. Dale A., *The strawberry into 21st century*, Proceedings of the Third North American Strawberry Conference, Huston, 121-123.