

GRAŻYNA MAŃKOWSKA  
IWONA RUTKOWSKA-KRAUSE  
ALEKSANDRA LUWAŃSKA  
KAROLINA WIELGUS  
JOANNA MAKOWIECKA

Zakład Biotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań

## Wykorzystanie kultury pylnikowej w celu polepszenia odporności na fuzariozę lnu włóknistego (*Linum usitatissimum* L.)

### Use of anther culture to improve flax (*Linum usitatissimum* L.) resistance to *Fusarium* wilt

Jedną z najpoważniejszych chorób występujących na plantacjach lnu włóknistego jest fuzarioza wywoływana przez grzyb z rodzaju *Fusarium*. Przy silnym stopniu porażenia uprawy lnu przez fuzariozę plon słomy może obniżyć się do 60%, nasion do 80%. W kulturach pylnikowych włóknistego (*Linum usitatissimum* L.) otrzymano regeneranty, u których przeprowadzono obserwacje dziedziczenia odporności na fuzariozę w pokoleniach R2–R4. W tym celu założono wazonowe i polowe doświadczenia prowokacyjne. Jako inokulum infekcyjne użyto następujące gatunki grzybów: *Fusarium oxysporum f.lini*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium gibbosum*, *Fusarium sambucinum* i *Fusarium poa*. Dla odmiany Alba, średnio wrażliwej na fuzariozę, otrzymano linie regenerantów odpornych na tę chorobę. Najlepszą okazała się linia regeneranta Alba 1000, u której obliczono 88 % roślin zdrowych w wazonowym doświadczeniu prowokacyjnym, natomiast w testach polowych zawsze uzyskiwała ocenę 9, ponieważ na poletku występowały tylko rośliny zdrowe.

**Słowa kluczowe:** inokulacja, odporność na fuzariozę, regeneranty lnu

One of the most serious diseases found on flax plantations is fusariosis caused by a fungi from *Fusarium* genus. A strong contamination of flax crops may reduce the straw yield to 60% and seeds yield to 80%. Anther cultures of flax (*Linum usitatissimum* L.) allowed obtaining regenerated plants, in which the inheritance of resistance to *Fusarium* was observed in R2–R4 generations. The provocative flowerpot and field experiments were conducted for this purpose. The following fungi species were used as infectious inoculum: *Fusarium oxysporum f.lini*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium gibbosum*, *Fusarium sambucinum* and *Fusarium poa*. For an Alba variety, which was moderately susceptible, there were resistant lines of regenerated plants obtained. A line Alba 1000 turned out to be the best one as there was 88% of healthy plants in the provocative flowerpot experiment. The line got 9 score in the field experiments, because the plants were always healthy.

**Key words:** inoculation, regenerated plants of flax, resistance to *Fusarium* wilt

## WSTĘP

Rodzaj len (*Linum*) należy do rodziny Inowatych (*Linaceae*) i obejmuje około 200 gatunków, z których tylko jeden, zwany lnem siewnym lub zwyczajnym (*Linum usitatissimum* L.), jest gatunkiem uprawnym, cenną rośliną włóknodajną i oleistą o dużym znaczeniu ekonomicznym. Otrzymanie nowych odmian lnu w oparciu o tradycyjne metody hodowli jest procesem trudnym i długotrwałym (trwa przeciętnie 12–17 lat). Szczególnie ważnym aspektem hodowli twórczej jest hodowla odpornościowa, dzięki której możliwe jest otrzymanie odmian odpornych na choroby (Andruszewska, 2006). Od wielu lat ten aspekt jest uwzględniany w hodowli odmian lnu włóknistego. W Polsce powinny to być odmiany odporne, na fuzariozę, która powoduje duże straty w plonach i często jest przyczyną dyskwalifikacji plantacji (Czyżewska, Zarzycka, 1969).

Wykorzystanie metod biotechnologicznych w połączeniu z doświadczeniami prowokacyjnymi jest podstawowym elementem w selekcji materiału roślinnego pod kątem odporności na fuzariozę i skróceniu okresu hodowli do 9 lat. Do tej pory opisano dodatnią korelację pomiędzy selekcją *in vitro* a odpornością na fuzariozę zregenerowanych roślin dla wielu gatunków, min. *Cucumis sativus* i jęczmienia (Chawła, 1987; El-Kazzaz, 2004). W zależności od stężenia czynnika selekcyjnego (filtratu *Fusarium oxysporum*) w medium hodowlanym uzyskano rośliny o zróżnicowanej odporności na patogena.

Celem przeprowadzonych badań było przetestowanie regenerantów lnu włóknistego odmiany Alba i ich potomstwa pod kątem odporności na fuzariozę. Badania te są kontynuacją prac rozpoczętych przez dr Iwonę Rutkowską-Krause w roku 1996 (Rutkowska-Krause i in., 2003).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny stanowiły pylniki pobrane w stadium jednojądrowym lnu włóknistego z roślin matecznych odmiany Alba (superelita), średnio wrażliwej na fuzariozę. W kulturach pylnikowych otrzymano trzysta zregenerowanych roślin, które oznaczono jako potomstwo R1. Celem obserwacji zmian w dziedziczeniu cech odporności na fuzariozę w pokoleniach R2 — R4 założono doświadczenie wazonowe, w hali wegetacyjnej w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Pętkowie. Wysiano potomstwo R2 wybranych pięciu linii regenerantów (Alba 989, 990, 991, 997, 1000 — numery zostały nadane przez hodowcę) do gleby inokulowanej mieszaniną kilku gatunków grzybów rodzaju *Fusarium*. Inokulum infekcyjne stanowiły następujące gatunki grzybów: *F. oxysporum f. lini*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. sambucinum* i *F. poae*. Celem przygotowania gleby do każdego wazonu dodawano 50 cm<sup>3</sup> inokulum, w tym 30 cm<sup>3</sup> nasion pszenicy przerośniętych gatunkiem *F. oxysporum* i 20 cm<sup>3</sup> nasion przerośniętych pozostałymi gatunkami grzybów (Andruszewska, Dryjańska, 1988). Doświadczenia obejmowały cztery powtórzenia, po 30 roślin na wazon. Porównano stopień porażenia fuzariozą regenerantów w odniesieniu do kontroli — superelity Alba. Liczono rośliny zdrowe i chore trzykrotnie: po wschodach, w

fazie „jodełki” (6–12 cm wysokości) i w czasie kwitnienia. Równocześnie założono doświadczenie w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Sielcu Starym na polu, na którym zainfekowano glebę mieszaniną sześciu gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* wyizolowanych z chorego lnu. Odporność oceniano na podstawie zdrowotności 1000 roślin z każdego regeneranta. W czasie testowania liczone rośliny zdrowe i chore w następujących stadiach rozwojowych lnu: po wschodach, w stadium „jodełki”, przed kwitnieniem oraz w stadium zielonej torebki. Na podstawie wyizolowanych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* identyfikowano przyczynę choroby. Kryterium oceny odporności w każdym roku testu, była liczba zdrowych roślin w stadium zielonej torebki, w stosunku do przyjętego wzorca (odmiany kontrolne). Jako wzorzec dla odmian lnu włóknistego przyjęto średni procent roślin zdrowych z odmian kontrolnych: Alby w latach 2001–2003 i w latach 2005–2007 Natasji + Nike.

Podstawą końcowej oceny był średni procent roślin zdrowych po zakończeniu cyklu badań danego regeneranta, tj. trzech lat testów, w porównaniu ze średnim procentem roślin zdrowych odmian kontrolnych w latach, w których testowany był dany regenerat.

W ocenie odporności stosowano skalę:

- bardzo odporne > 95% roślin zdrowych w stosunku do kontroli,
- odporne > 80–95% roślin zdrowych w stosunku do kontroli,
- średnio odporne > 50–80% roślin zdrowych w stosunku do kontroli,
- średnio podatne > 30–50 % roślin zdrowych w stosunku do kontroli,
- bardzo podatne < 30% roślin zdrowych w stosunku do kontroli.

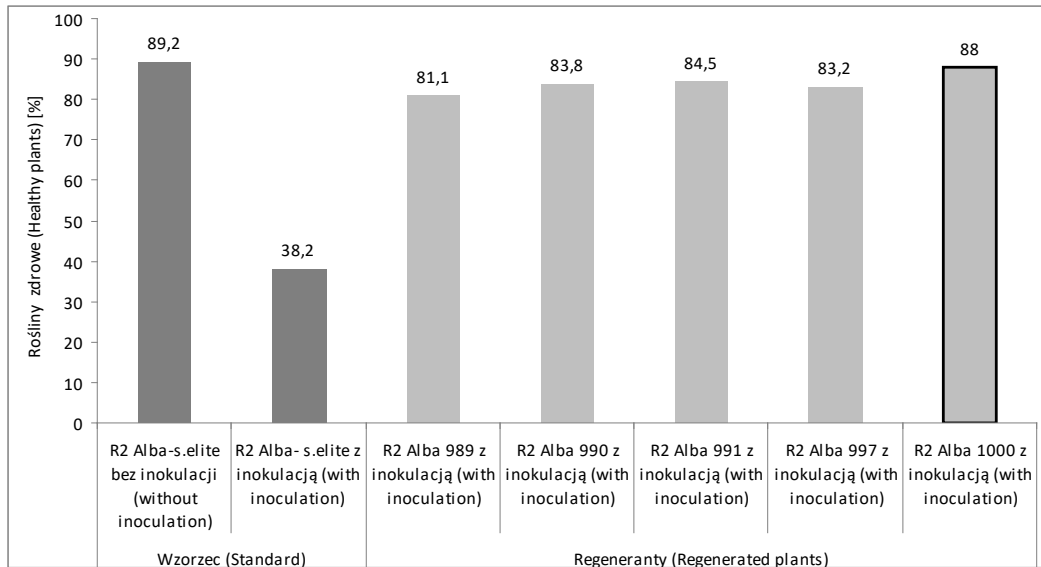
Natomiast w doświadczeniach polowych w ocenie zdrowotności roślin wykorzystano metodykę Heimanna (1983).

#### WYNIKI I DYSKUSJA

W oparciu o wyniki w doświadczeniu wazonowym zaobserwowano wyraźne zwiększenie odporności na fuzariozę potomstw R2–R4 w porównaniu z odmianą wyjściową. Należy zaznaczyć, że odmiana wyjściowa Alba należy do średnio wrażliwych na tę chorobę i w latach sprzyjających wystąpieniu choroby odnotowuje się duże straty plonu. Wytypowano potomstwo linii regeneranta Alba 1000. Wyniki przedstawiono na rysunku 1.

Powyższe wyniki potwierdziła ocena zdrowotności wybranych linii regeneratów w doświadczeniach polowych w Zakładzie Doświadczalnym IWNiRZ Pętkowo. W pierwszym roku doświadczeń polowych uzyskano podwyższoną odporność linii R2 Alba 991, R2 Alba 997 i R2 Alba 1000, natomiast linie R2 Alba 989 i R2 Alba 990 nie różniły się na polu od odmiany wyjściowej (obie otrzymały ocenę 5 w skali dziewięciostopniowej) i pomimo dobrego wyniku w doświadczeniu wazonowym, nie testowano już ich w latach następnych. Ze względu na wysoki koszt doświadczeń polowych zrezygnowano z ponownego testowania linii, które w jednym roku badań okazały się wrażliwe na fuzariozę. Oparto się na doświadczeniu hodowcy z Zakładu Doświadczalnego IWNiRZ w Pętkowie (E. Rutkowska, informacja ustna), jeżeli raz linia

okazała się wrażliwa, to w następnych latach, w sprzyjających warunkach na pewno wystąpi u niej porażenie tą chorobą. W drugim roku kontynuowano ocenę R3 linii Alba 991, 997 i 1000 i dołączono do doświadczenia pokolenie R2 linii Alba 431 i 432, ponieważ nasiona tych linii zebrano kilka tygodni później. Wszystkie badane linie były lepsze od odmiany wyjściowej, otrzymały ocenę 9, a linia 431 — ocenę 8 w skali dziesięciopniowej.



**Rys. 1. Porównanie odporności na fuzariozę odmiany Alba (superelita) oraz wybranych linii regenerantów R2 otrzymanych z niej w kulturach pylnikowych. Doświadczenie wazonowe — hala wegetacyjna**

**Fig. 1. A comparison of resistance to of Alba variety (super elite) and chosen lines of R2 regenerated plants obtained by anther culture. Flowerpot experiment — a growth room**

W trzecim roku badań dołączono potomstwo R2 następnych dwóch regenerantów otrzymanych w kulturach pylników (Alba 11 i Alba 12) i kontynuowano badanie pokolenia R4 Alby 991, 997 i 1000 oraz pokolenia R3 Alby 431 i 432. Również w tym roku linie pochodzące od regenerantów były bardziej odporne, jedynie Alba 12 uzyskała ocenę 6, taką samą jak odmiana wyjściowa (tab. 1).

Na szczególną uwagę zasługuje wspomniana wcześniej linia regeneranta Alba 1000. W latach 2001–2003 wybrana linia została przetestowana na polu prowokacyjnym w Zakładzie Doświadczalnym IWNiRZ w Sielcu Starym. W porównaniu ze wzorcem, który stanowiła odmiana Alba odporność na fuzariozę linii 1000 wynosiła 125,8% w stosunku do kontroli (tab. 2).

Tabela 1

**Ocena zdrowotności pokoleń R2, R3, i R4 wybranych linii regenerantów pylnikowych odmiany Alba w doświadczeniach polowych według metodyki Heimanna**  
**Results of the *Fusarium* wilt resistance test of the R2, R3 and R4 progenies of the nine lines regenerated through anther culture. According to Heimann's scale (Heimann, 1983)**

Linia (nr identyfikacyjny) Line (identity no.)	I rok doświadczeń The first year of experiment		II rok doświadczeń The second year of experiment		III rok doświadczeń The third year of experiment	
	pokolenie generation	ocena odporności resistance evaluation	pokolenie generation	ocena odporności resistance evaluation	pokolenie generation	ocena odporności resistance evaluation
Kontrola (Standard): Alba super elita		5		6		6
Linie regenerantów Lines of regenerated plants						
Alba 989	R2	5				
Alba 990	R2	5				
Alba 991	R2	8	R3	9	R4	8
Alba 997	R2	8	R3	9	R4	8
<b>Alba 1000</b>	<b>R2</b>	<b>9</b>	<b>R3</b>	<b>9</b>	<b>R4</b>	<b>9</b>
Alba 431			R2	8	R3	8
Alba 432			R2	9	R3	8
Alba 11					R2	8
Alba 12					R2	6

Tabela 2

**Zbiornicze zestawienie testowania linii na polu prowokacyjnym ZD IWNiRZ Sielec Stary w latach 2001–2003, dane udostępnione przez Laboratorium Fitopatologii IWNiRZ**  
**Comparison of provocative tests results of lines conducted at INF&MP Experimental Station Sielec Stary in 2001–2003, data provided by INF&MP Phytopathology Laboratory**  
**Wzorzec Alba — Alba standard**

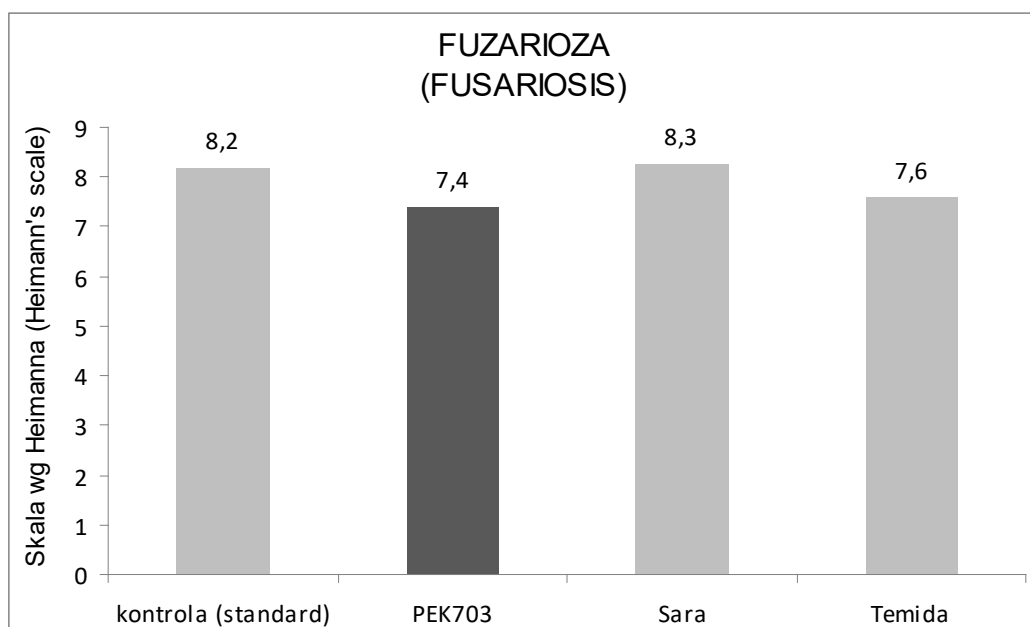
Linie regenerantów Lines of regenerated plants	W stosunku do kontroli Comparison to the standard	Ocena odporności Evaluation of the resistance
Alba 431	120,6	bardzo odporna — very resistant
<b>Alba 1000</b>	<b>125,8</b>	<b>bardzo odporna — very resistant</b>
Alba 997	171,0	bardzo odporna — very resistant
Alba 432	162,7	bardzo odporna — very resistant
Alba 11	149,1	bardzo odporna — very resistant
Alba	74,3	średnio odporna — moderately resistant

W latach 2004–2006 linia regeneranta Alba 1000 została zakwalifikowana przez hodowców jako ród PEK 703 i porównana w doświadczeniu polowym ze wzorcem Natasja i Nike. Odmiany stanowiące wzorzec Nike i Natasja zaliczane są do odmian lnu włóknistego bardzo odpornych na fuzariozę. Wzięto pod uwagę pierwszy i drugi rok doświadczeń, ponieważ badany ród w znacznym stopniu przewyższał odpornością wzorzec (tab. 3).

Średni % roślin zdrowych w latach testu 2004–2006 dla rodu PEK 703 (Alba 1000)  
Average % of healthy plants in 2004–2006 for PEK 703 (Alba 1000)  
Wzorzec Natasja i Nike — Natasja and Nike standard

Rok Year	Odmiana/ród Cultivar/Line	W stosunku do kontroli Comparison to the standard	Ocena odporności Evaluation of the resistance
I rok doświadczeń The first year of experiment	Nike + Natasja PEK 703	100,0 106,7	b. odporna — very resistant b. odporna — very resistant
II rok doświadczeń The second year of experiment	Nike + Natasja PEK 703	100,0 124,9	b. odporna — very resistant b. odporna — very resistant
III rok doświadczeń The third year of experiment	Nike + Natasja PEK 703	100,0 98,9	b. odporna — very resistant b. odporna — very resistant

Po konsultacjach z hodowcami ród PEK 703 został włączony do badań COBORU Słupia Wielka w latach 2005–2007 na odporność na fuzariozę i porównany z odmianami lnu włóknistego Sara i Temida wyhodowane przez Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu jako odmiany bardzo odporne (rys. 2).



Rys. 2. Ród PEK 703 w porównaniu z wzorcem i innymi odmianami lnu włóknistego Sara i Temida  
Fig. 2. PEK 703 line compared with control and other flax cultivars (Sara and Temida)

#### PODSUMOWAMIE

Proces hodowlany lnu włóknistego z wykorzystaniem metod biotechnologicznych i doświadczeń prowokacyjnych umożliwił uzyskanie roślin odpornych na fuzariozę dla

odmiany Alba, średnio podatnej na tego patogena. Ostra selekcja negatywna pod kątem odporności na fuzariozę w warunkach prowokacyjnych — gwarantuje możliwość wyhodowania odmian lnu odpornych na tę chorobę.

W naszych badaniach cel, który sobie postawiliśmy został osiągnięty i stanowił pierwszy krok w polepszeniu odporności na fuzariozę odmiany Alba.

W wyniku mniejszej podatności roślin na fuzariozę istnieje możliwość uzyskania wysokich plonów słomy i nasion przy ograniczonej ilości stosowanych środków chemicznych.

#### LITERATURA

- Andruszewska A., Dryjańska M. 1988. Wpływ preparatów zawierających mikroelementy na porażenie lnu przez fuzariozę. Roczniki Nauk Rolniczych, seria E, T. 18, Z. 1: 207 — 213.
- Andruszewska A. 2006. Występowanie i zwalczanie chorób. Poradnik plantatora lnu włóknistego, IWN: 37 — 44.
- Czyżewska S., Zarzycka H. 2001. Z badań nad patogenicznością grzybów z rodzaju *Fusarium* występujących na lnieniu (*Linum usitatissimum* L.). Prace Nauk. Inst. Ochr. Roślin, PWRiL 10 (2): 87 — 116.
- Chawla H.S., Wenzel G. 1987. In vitro selection for fusaric acid resistant barley plants, Plant Breeding, 1987, 99: 159 — 163.
- EL-Kazzaz A. A., Ashour A. M. A. 2004. Genetically resistant cucumber plants to wilt pathogen via tissue cultures, Egypt. J. Phytopathol. 32: 1 — 10.
- Heimann St. 1983. Len włóknisty i konopie — metodyka prowadzenia doświadczeń odmianowych COBORU Słupia Wielka.
- Rutkowska-Krause I., Mańkowska G., Łukaszewicz M., Szopa J. 2003. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*, Plant Cell Rep. 22: 110 — 116.