

EFEKTYWNOŚĆ TERMOTERAPII I CHEMIOTERAPII W UWALNIANIU ROŚLIN ZIEMNIAKA OD WIRUSA S

mgr inż. Dorota Michałowska, dr inż. Agnieszka Przewodowska

mgr inż. Joanna Piskorz, mgr inż. Oksana Olejnik

IHAR-PIB, Pracownia Zasobów Genowych i Kultur in vitro w Boninie

e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl

Głównym założeniem utworzenia i prowadzenia Banku Genów ziemniaka w Boninie było gromadzenie i utrzymywanie zasobów ziemniaka *in vitro* w stanie żywym i wolnym od patogenów, w tym od wirusów. Wirusy stanowią duże zagrożenie dla hodowli ziemniaka, gdyż liczba chorych roślin wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego. Dlatego ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001) i utrzymanie zdrowego materiału w kulturach *in vitro*. Do uzyskania zdrowego materiału wyjściowego wykorzystuje się hodowlę merystemów wierzchołkowych pędów połączoną z termoterapią oraz chemioterapię jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Termoterapia

Termoterapia polega na długotrwałym traktowaniu podwyższoną temperaturą (35-45°C) roślin lub eksplantatów (Malepszy 2001). Przez 4 do 8 tygodni rośliny doświetla się światłem jarzeniowym o natężeniu ok. 4500 lx, w cyklu dzień/noc 16/8. W zależności od kondycji roślin poddanych termoterapii po 4 lub 8 tygodniach z roślin pobierane są pąki wierzchołkowe i boczne, z których następnie izoluje się merystemy. Merystemy umieszczane są pojedynczo w probówkach na podłożu MS (Murashige, Skoog) zestalonej agarą (0,3%), z dodatkiem kinetyny (0,04 mg/l) i kwasu giberylinowego (0,1mg/l). Pojemniki z merystemami przebywają w fitotronie hodowlanym nawet do 6 miesięcy (16 godzin na świetle 8 W·m² w temp. 22°C oraz 8 godz. w ciemności w temp. 20°C). Proces regeneracji jest długotrwały i pierwsze rośliny *in vitro* uzyskuje się po 2-6 miesiącach.

W naszych badaniach z odmiany Leonata porażonej wirusem S (PVS), poddanej termoterapii, wyizolowano 130 merystemów. Pąki kątowe zostały podzielone między dwóch wykonawców. Procent otrzymanych roślin *in vitro*, w tym roślin uwolnionych od wirusa, jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów, był zależny m.in. od wykonawcy i wielkości wyizolowanego merystemu. W zależności od wykonawcy uzyskano od 16,2 do 8% roślin wolnych od wirusa S ziemniaka (tab. 1).

Tabela 1

Procent roślin *in vitro* uzyskanych z merystemów w zależności od wirusa i wykonawcy

Odmiana	Wykonawca	Liczba wyizolowanych merystemów	Liczba uzyskanych roślin <i>in vitro</i>	%	Liczba uwolnionych od wirusa roślin <i>in vitro</i>	%
Leonata (PVS)	1	80	46	57,5	13	16,2
	2	50	19	38	4	8

Chemioterapia

Chemioterapia polega na dodaniu antymetabolitów do pożywki, na której prowadzi się kultury merystemów lub fragmentów jednowęzłowych. Antymetabolity stosowane w chemioterapii są to analogi nukleotydów, o wysokiej aktywności przeciwwirusowej, włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym, hamując tym samym ich namnażanie (Malepszy 2001). Najczęściej stosowanymi chemioterapeutykami są: rybawiryna, tiouracyl i zieleń malachitowa.

W naszych badaniach jako chemioterapeutyk zastosowano rybawirynę – syntetyczny analog nukleozydy purynowej. Rośliny *in vitro* 2 odmian, tj. Linzer Starke i Eugenia, u których testem DAS ELISA stwierdzono wysokie porażenie PVS, poddano działaniu rybawiryny w stężeniach: 30, 40 i 50 mg/l pożywki. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS (Murashige, Skoog) zestalonej agarą (0,4%) z dodatkiem rybawiryny. Pożywkę MS z pH ustalonym na poziomie 5,8 poddano sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu, tj. temp. 121°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 minut. Do sterylnej pożywki, za pomocą filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki rybawiryny. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczone na pożywkę bez dodatku antymetabolitu.

Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16 godzin dzień w temp. 22°C, oświetleniu 8 W·m² i 8 godzin noc w ciemności w temp. 20°C przez okres 3-4 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tzn. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, ulistnienie i współczynnik rozmnożenia (liczba międzywęzli). W 4. tygodniu z każdej kombinacji wysadzono rośliny w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 3-4 tygodniach wyrosłe sadzonki przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach.

Rybawiryna dodana do podłoża w dawce 30 i 40 mg/l nieznacznie obniżyła poziom ekstynkcji wirusa S. Jednocześnie jej fitotoksyczne działanie na rozwój roślin *in vitro* było wprost proporcjonalne do stężenia. Dawka 50 mg/l miała negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro* (silne fitotoksyczne działanie), rośliny były znacznie słabsze od roślin kontrolnych i nie korzeniły się, więc nie uzyskano z nich materiału do testu DAS ELISA.

WNIOSKI

1. Na uzyskanie roślin wolnych od PVS po zastosowaniu termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na co składa się precyzja i wielkość izolowanego merystemu.
2. Rybawiryna dodana do pożywki nieznacznie zmniejsza koncentrację PVS wprost proporcjonalnie do stężenia.
3. Dodanie do podłoża dawki 50 mg/l rybawiryny działa fitotoksycznie na wyszczone eksplantaty.

LITERATURA

1. Downar-Zapolska J., Sekrecka D. 2017. Metody eliminowania wirusów z roślin ziemniaka – przegląd literatury. – *Ziemn. Pol.* 3: 24-31
2. Faccioli G. 2001. Control of Potato Viruses Using Meristem and Stem-cutting Cultures. *Thermotherapy and Chemotherapy*. Ed. Virus and Virus-like Disease of Potatoes and production of seed potatoes: 382-385
3. Malepszy S. 2001. *Biotechnologia roślin*. PWN Warszawa: 36