

Lp. w zał.do Rozporządzenia MRiRW; 63

Tytuł zadania: **Eliminacja patogenów niekwartantowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w Banku *in vitro***

Kierownik zadania: inż. Danuta Sekrecka

Cel projektu:

Głównym celem projektu są prace nad doskonaleniem metod uwalniania roślin ziemniaka od patogenów niekwartantowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro*.

W 2016 roku w ramach zadania 63 prace badawcze prowadzono w dwóch tematach:

Temat 1. Opracowanie metod skutecznego uwalniania od wirusów genotypów wprowadzanych do Banku Genów *in vitro* ziemniaka.

Cel tematu

Głównym celem tematu badawczego jest dopracowywanie metod eliminacji wirusa S i M ziemniaka z genotypów gromadzonych w Banku Genów *in vitro*.

Choroby wirusowe ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty w plonie bulw. Największe zagrożenie stanowi wirus Y ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirus S i M ziemniaka, które łatwo się rozprzestrzeniają mogą powodować straty rzędu 30% (Kostiw 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego a także są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001). W ramach tematu badawczego zaplanowano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów S i M ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Materiał i metody

Termoterapia. Bulwy trzech odmian; Birte, Paroli i Soraya porażone wirusem S ziemniaka wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w fitotronie. Przez okres 4-5 tygodni rośliny poddane zostały działaniu wysokiej temperatury: 37/33°C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W.m<sup>2</sup> z zachowaniem 16 godzinnego fotoperiodu. W 5. tygodniu trwania termoterapii pobrano z roślin pąki kątowe i wyizolowano z nich merystemy. Z każdego genotypu merystemy izolowało 3 wykonawców (zbadano czynnik osobowy) i wyizolowano średnio po 100 merystemów. Przed izolacją merystemów materiał roślinny sterylizowano w 70% etanolu przez 20 sekund oraz w 1,5% roztworze chloraminy przez 15 minut. Następnie wykonano 4-krotne płukanie fragmentów roślin w sterylnej destylowanej wodzie. Z pąków kątowych izolowano merystemy wielkości 0,2-0,4mm i umieszczano je pojedynczo w probówkach na pożywkę MS (Murashige, Skoog, 1962) zestalonej agarą (0,4%), z dodatkiem kinetyny 0,04 mg/l i kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>) – 0,1 mg/l. Prowadzono sukcesywne obserwacje wyszczepionych merystemów, usuwając ewentualne zakażenia grzybowo-bakteryjne. W miarę wzrostu i rozwoju merystemy przeszczepiano na świeżą pożywkę aż do uzyskania roślin *in vitro*. Probówki z merystemami a następnie z roślinami *in vitro* utrzymywano w fitotronie w optymalnych warunkach dla ich rozwoju tj. 16 godzin na świetle w temperaturze 22°C oraz przez 8 godzin w ciemności w temperaturze 20°C. Chemioterapia. Rośliny *in vitro* 2 genotypów: Linzer Starke (porażony wirusem S ziemniaka-2,500) i TE-1 (wirus M ziemniaka – 0,918) poddano działaniu 2 substancji antywirusowych (rybawiryna i zieleń malachitowa). Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem rybawiryny lub zieleni malachitowej. Pożywkę MS z ustalonym pH na poziomie 5,8 poddano sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu sterylizacji (temperatura 121°C, ciśnienie 0,2MPa i czas 15 minut). Do sterylnej pożywki, przy pomocy filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki rybawiryny (RBV) i zieleni malachitowej (ZM). W roku 2016 dawki te zostały zwiększone w stosunku do dawek z 2015 roku. I tak RBV dodano w ilości 10, 20 i 25 mg/l pożywki a zieleń malachitową – 0,2; 0,3 i 0,4 mg/l. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczepione na pożywkę bez antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie, w temperaturze 22-20°C z zachowaniem 16 godzinnego dnia i oświetleniu ok. 8 W.m<sup>2</sup> przez okres 3-4 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro* tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, ulistnienie oraz współczynnik rozmnażania (liczbę międzywęźli). W 4. tygodniu z każdej kombinacji wysadzono po 10 roślin w szklarni do doniczek z

substratem torfowym. Po kolejnych 4-5 tygodniach rośliny przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Wykonano 2-krotne testy zdrowotnościowe. Doświadczenie z antymetabolitami wykonano w pięciu powtórzeniach. Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie. Istotność różnic oceniono za pomocą testu Tukey'a przy  $p=0,05$ .

#### Wyniki

Z genotypów (Birte, Paroli i Soraya) poddanych termoterapii wyizolowano po ok. 100 merystemów. Pąki kątowe zostały podzielone pomiędzy 3 wykonawców. Procent roślin *in vitro*, w tym roślin uwolnionych od wirusa, jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów był zależny od ich wielkości ale także w dużym stopniu od wykonawcy. Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne różnice pomiędzy wykonawcami oraz liczbą uwolnionych od wirusa S roślin w stosunku do liczby roślin uzyskanych z merystemów. W chemioterapii zastosowano wyższe dawki antymetabolitów. Rybawiryna w dawce 25 i 20 mg/l znacznie obniżyła poziom ekstynkcji wirusa S ziemniaka w roślinach *in vitro*. Wyższe dawki RBV, podobnie jak w latach ubiegłych, miały negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Z kolei zieleń malachitowa, której dawki w roku 2016 zostały 10-krotnie zwiększone nie miała wpływu zarówno na eliminację wirusa S z roślin jak i na ich wzrost i rozwój. Analiza wariancji wykonana dla wirusa S ziemniaka wykazała istotne różnice zarówno dla zastosowanych antymetabolitów jak i ich dawek. Dla wirusa M ziemniaka nie wykazano takiej zależności i analiza nie wykazała istotnych różnic w teście Tukeya ( $p=0,05$ ).

#### Dyskusja

Przez lata wielu badaczy próbuje znaleźć idealny sposób na wyeliminowanie wirusów z roślin. Już w 1952 roku ukazały się pierwsze informacje w literaturze o tym, iż wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin 1952). Kolejne badania wykazały że ilość roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam i Tedesse, 2008). Jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Ali i in 2013). W tegorocznych badaniach wykazaliśmy również jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin *in vitro* ma czynnik ludzki. Z materiału poddanego tym samym warunkom termoterapii, w zależności od wykonawcy uzyskano z merystemów od 81,11% do 22,69% roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa S ziemniaka od 62,22% (wyk.1) do 14,29% (wykonawca 3). Antymetabolity stosowane w chemioterapii to analogi nukleotydów, o wysokiej aktywności przeciwwirusowej, włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym i hamując tym samym ich namnażanie (Malepszy 2001). Noris (1954) oraz Oshima i Livingstone (1961) zaobserwowali, że po zastosowaniu zieleni malachitowej zmniejsza się koncentracja wirusa X ziemniaka. Z kolei Nasir i in (2010) oraz Mahmoud i in (2009) uważają iż rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV. Jednocześnie wraz ze zwiększeniem stężenia rybawiryny w pożywce następuje proporcjonalny wzrost liczby roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii ale zmniejsza się liczba roślin zdolnych do regeneracji (Nasir i in. 2010, Mahmoud i in 2009). Nasze badania potwierdziły iż wyższa dawka rybawiryny obniża poziom ekstynkcji wirusa S ziemniaka ale jednocześnie działa fitotoksycznie na eksplantaty. Zieleń malachitowa nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa S i M ziemniaka.

#### Wnioski

Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa S ziemniaka poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na co składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu. Rybawiryna dodana do pożywki zmniejsza koncentrację wirusa S ziemniaka wprost proporcjonalnie do stężenia.

Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa M ziemniaka. Zieleń malachitowa w zastosowanych dawkach nie miała wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa S i wirusa M ziemniaka w roślinach *in vitro*

#### Cytowana literatura

Ali M.A., Nasiruddin K.M., Hanque M.S., Faisal S.M. 2013. Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARA J.Agr. 11(1): 71-80; Biniam T., Tedesse M. 2008. A survey of Vidal status on potatoes grown in eritrea and in vitro elimination of local variety Tsaeda embaba. Afri.J.Biotech. 7(4): 397-403; Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywoływane przez wirusy. Wieś Jutra 3(20): 27-29; 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; *Kostiw M.* 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasiennej ziemniaka. *Więś Jutra* 1 (174): 28-29; *Mahmoud S.Y.M., Hosseiny M.H., Abdel-Ghaffar M.H.* 2009. Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. *Int.J.Virol.* 5(2): 64-76; *Malepszy S.* 2001. Biotechnologia roślin. PWN. Warszawa 2001: 36; *Morel G., Martin C.* 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C.R.Acad.Sci.* 235, 1324-1325; *Murashige T., Skoog F.* 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15; 473-479; *Nasir I.A., Tabassum B., Latif Z., Javed M.A., Haider M.S., Husnain T.* 2010. Strategies to control potato virus Y under in vitro conditions. *Pak.J.Phytopathol.* 22b(1):63-70; *Norris D.O.* 1954. Development of virus-free stock of Green Mountain potato by treatment with malachite green. *Australian J.Agricul.Res.* 5, 658-663; *Oshiman N., Livingston C.H.* 1961. The effects of antiviral chemicals on potato virus X. *Am.Potato J.* 38: 294-299; *Zaklukiewicz K.* 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. *Ziemniaka* 1981/82: 137-160.

## Temat 2. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka

### Cel tematu

Celem tematu w 2016 roku było dalsze badania trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych pod kątem skuteczności zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności.

Bakterie endofityczne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. I nawet największa staranność w procesie mikrorozmnażania nie daje stuprocentowej pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno jest powiedzieć o kulturach *in vitro* że są sterylne. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in. 2012). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. Proces ten ujawnia się w kulturach 3-5 dnia od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych. Na rynku dostępne są różne preparaty bakteriobójcze m.in. PPM<sup>TM</sup>, ProClin 300®, Nitrofurazone, które w naszych badaniach sprawdzamy pod kątem ich skuteczności i fitotoksyczności.

### Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 4 odmian: Sonda, Pasja Pomorska, Zebra i Gwiazda pozyskane z Banku Genów *in vitro*, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano trzy: Plant Preservative Mixture<sup>TM</sup> (PPM), ProClin300® i Nitrofurazone (5 Nitro-2furaldehyde-semicarbazone). Preparaty te są stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych gatunków roślin, brakuje jednak informacji na temat stosowania w kulturach *in vitro* ziemniaka. **Preparat Plant Preservative Mixture<sup>TM</sup>** to mikstura, która jest biocydem o szerokim spektrum zastosowania i polecana w hodowli tkanek roślinnych. Stosowana przeciw bakteriom i grzybom rosnącym w pożywce jak i w zanieczyszczonych tkankach. W zależności od dawki i stopnia zakażenia może pełnić funkcję składnika biostatycznego jak i środka zapobiegawczego. **ProClin 300®** jest biocydem oraz konserwantem do odczynników stosowanych w diagnostyce *in vitro*. W literaturze przedstawiany jako wysoce efektywny środek z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności, a także niskiej toksyczności. Nie wykazywał fitotoksyczności dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosta. **Nitrofurazone-** stosowany m.in. w mikrorozmnażaniu *in vitro* bananów, ananasa, trzciny cukrowej. Polecany jako chemioterapeutyk o działaniu bakteriostatycznym, a w większych stężeniach bakteriobójczym wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (Chamberlain 1976). Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiono na pożywkę Murashige-Skoog'a, z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Standardowa pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, myo-inozytolu, sacharozy i zestalona agarem (0,4%) została poddana sterylizacji parą wodną (121°C) przez 15 minut, a następnie pod komorą laminarną (w warunkach sterylnych) przy pomocy filtrów strzykawkowych dodano do niej ustalone dawki preparatów. W roku sprawozdawczym zastosowano następujące dawki preparatów: PPM w stężeniach 0,0 (kontrola); 0,3; 0,4 i 0,5%, ProClin 300® w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,01; 0,015; 0,02% a Nitrofurazone w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,4; 0,5 i 0,6% . Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie przez okres 4 tygodni, w temperaturze 22-20°C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok.

8W.m<sup>2</sup>. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano 3 dnia po wyszczepieniu eksplantatów. Do 7. dnia dokładnie można zaobserwować wystąpienie mgielek, wskazujących na obecność bakterii endogennych. Przez kolejne tygodnie opisywano wzrost i rozwój roślin *in vitro* zwracając szczególną uwagę na skuteczność i fitotoksyczne działanie zastosowanych preparatów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślin dla każdej kombinacji oraz kontrolę (4 odmiany x 9 pożywek + kontrola x 4 powtórzenia = 2720 testów).

#### Wyniki

W zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodanie do pożywki preparatu ProClin 300® w najwyższej dawce – 0,02% eliminowało zanieczyszczenia bakteryjne średnio w 40% kultur (zakres 25,0-51,67%). Jednocześnie nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu. Z kolei PPM<sup>TM</sup>, podobnie jak w latach poprzednich, nie wykazał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty a nawet najniższe dawki (0,3%) w dużym stopniu eliminowały bakterie endogenne (31,7-63,3%). Wyższa dawka PPM – 0,5% to również wyższy procent kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych (61,7-95,0%). Dodanie do pożywki Nitrofurazone, w dawkach wyższych niż w 2015 roku, nie miało wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian. Nie zaobserwowano również reakcji fitotoksycznych. Trzyczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne różnice pomiędzy odmianami oraz preparatami i zastosowanymi dawkami.

#### Dyskusja

Biocyd PPM<sup>TM</sup> został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, petunia, tytoń (Compton, Koch 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ PPM w ograniczaniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę iż musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku roślin, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej (Rihan i in. 2012). Orlikowska i in. (2012) wykazali iż PPM i Vitrofurale dodane do pożywki ograniczają wzrost bakterii na okres od 1 do 21 dni, zależnie od rodzaju bakterii, rodzaju i stężenia biocydu. Jednocześnie zastosowane dawki wpłynęły na wzrost i rozwój ocenianych roślin. Rośliny były mniejsze i słabiej się korzeniły w stosunku do roślin kontrolnych. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych lub bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego tak ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością. W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka, natomiast Nitrofurazone w zastosowanych dawkach nie wyeliminował bakterii endogennych.

#### Wnioski

Preparat PPM<sup>TM</sup> w badanych dawkach ograniczył zanieczyszczenia bakteryjne w zakresie 50-95%. Niższe dawki ProClin 300® nie wykazały objawów fitotoksycznych, ale jednocześnie ograniczyły zanieczyszczenia bakteryjne do 40%. Nitrofurazone w zastosowanych dawkach nie miał wpływu na eliminację zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka. Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki biocydów wyeliminują bakterie endogenne z kultur *in vitro*.

#### Cytowana literatura

Chamberlain R.E. 1976. Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. J. antimicrob. Chemother., 2, 325-332; Compton M., Koch J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37, 259-261; Hail Z. Rihan, Mohammed Al.-Issawi, Fadil Al.-swedi, Michael P. Fuller. 2012. The effects of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. Sci. Hortic. 141, 47-52; Orlikowska T., Zawadzka M., Zenktele E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofurale on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. THE Journal of Horticultural Science & Biotechnology. Vol. 87. No:3, 223-230

#### Prace opublikowane

Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoderapia i chemioterapia – skuteczność metod w eliminacji wirusa S i M ziemniaka. Streszczenia 49. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, 53-54 (sprawozdanie z 2015 r. strony 3-7)

Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoterapia i chemioterapia – porównanie skuteczności metod w eliminacji wirusów S i M ziemniaka. *Ziemniak Polski* 4/2016, 10-15 (3-7)