

Eliminacja patogenów niekwarrantowanych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku in vitro. 2014-2020

Zespół wykonawców:

D. Michałowska – d.michalowska@ihar.edu.pl

D. Sekrecka (kierownik zadania w latach 2014-2017)

W. Przewodowski

S. Wróbel

A. Krzewińska

J. Downar-Zapolska

T. Erlichowski

J. Piskorz

A. Przewodowska

P. Buryło

O. Olejnik

P. Gierszewska

Cele projektu, które osiągnięto

1. Uwolnienie wybranych genotypów ziemniaka od wirusa PVS, PVM i PVY przy zastosowaniu termoterapii i izolacji merystemów.
2. Przebadanie skuteczności kilku substancji antywirusowych w uwalnianiu roślin in vitro ziemniaka od wirusów PVS, PVM i PVY przy zastosowaniu chemioterapii.
3. Przebadanie skuteczności kilku preparatów bakteriobójczych w zwalczaniu zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro wybranych genotypów ziemniaka.
4. Przebadanie trwałości efektu bakteriobójczego PPM™, ProClin300® w kolejnych pasażach roślin in vitro.
5. Sprawdzenie wpływu preparatów bakteriobójczych na tworzenie mikrobulw w procesie mikrotuberyzacji wybranych genotypów ziemniaka.

Materiały i metody

1. Termoterapia

- rośliny wyrosłe z bulw ziemniaka porażonych wirusami PVS, PVM, PVY poddane działaniu wysokiej temp. 37°C w dzień i 33°C w nocy przez okres 6-8 tyg.;
- preparowanie pod mikroskopem merystemów;
- badanie testem DAS ELISA wyrosłych roślin in vitro (test zdrowotności).

2. Chemioterapia

- pasażowanie jednowęzłowych fragmentów porażonych wirusami PVS, PVM, PVY roślin na podłoża z dodatkiem substancji antywirusowych – rybawiryna, zieleń malachitowa, azacytydyna, tiouracyl;
- badanie testem DAS ELISA wyrosłych roślin in vitro (test zdrowotności).

3. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka

- pasażowanie jednowęzłowych fragmentów roślin, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne na podłoża z dodatkiem preparatów bakteriobójczych – PPM, ProClin 300®, Nitrofurazone, Citrosept, azotan srebra (Ag NO_3), podchloryn sodu (NaClO);
- obserwacja kultur - sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach in vitro jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „halo” wokół eksplantatu.

Wyniki – termoterapia

1. termoterapia roślin wyrosłych z porażonych wirusami bulw pozwala na izolację silniejszych merystemów i w rezultacie wyższy procent (od 20 do 40%) uzyskanych roślin in vitro niż izolacja z porażonych wirusami roślin in vitro;
2. najkorzystniejszy termin przeprowadzenia procesu to maj – wrzesień (styczeń – 1,85%, luty – 4,22%, maj – 15%, wrzesień – 30% zregenerowanych roślin);
3. wielkość izolowanych merystemów - łatwiej uzyskać rośliny z merystemów większych mających większą liczbę zawiązków liści (2-4) niż z małych (tylko kopia merystematyczna);
4. z większych eksplantatów trudniej uzyskać rośliny wolne od wirusów. Izolowanie z 2-4 zawiązkami liści zalecane jest jedynie w przypadku wprowadzania do banku zdrowego i sprawdzonego testem genotypu;
5. na uzyskanie roślin wolnych od wirusa PVS, PVM i PVY poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy (w zależności od wykonawcy uzyskano od 34% do 24% roślin wolnych od PVS, od 52% do 43% roślin wolnych od PVM i od 85% do 78% wolnych od PVY);
6. rodzaj wirusa - duży problem w uwalnianiu stwarzają wirusy PVS i PVM, z kolei PVY jest wirusem, który łatwo uwalnia się pod wpływem działania wysokiej temperatury;
7. duże znaczenie ma precyzyjne cięcie eksplantatów, szybkie umieszczenie ich na pożywce w taki sposób, aby powierzchnia cięcia przylegała do podłoża.

Wyniki - chemioterapia

Włączenie do pożywek substancji antywirusowych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych, dlatego konieczne było eksperymentalne wybranie odpowiedniego antymetabolitu i ustalenie jego stężenia w odniesieniu do roślin in vitro ziemniaka.

1. Rybaviryna

- dawka > 50 mg/l działa fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty ziemniaka
- dawki 30-40 mg/l zmniejszają koncentrację wirusa PVS wprost proporcjonalnie do stężenia antymetabolitu
- zastosowane dawki 20-40 mg/l nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM
- dawki 30-40 mg/l znacząco eliminują cząstki wirusa PVY (o 30%).

2. Zieleń malachitowa

- dawki 0,02-0,04 mg/l nie eliminowały cząstek wirusów PVS i PVM z roślin in vitro ziemniaka.
- zastosowane dawki 0,02-0,04 mg/l spowodowały zamieranie wyłożonych merystemów.

3. Azacytydyna

- dawki 20-40 mg/l nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusów PVS i PVM
- przy zastosowaniu dawki 30 mg/l uzyskano 20% roślin wolnych od wirusa PVY
- dawka 40 mg/l wpłynęła negatywnie na rośliny in vitro, większość wyszczepionych fragmentów nie korzeniła się i nie rosła, tworzyły się mikrobulwy.

Wyniki - chemioterapia

4. Tiouracyl

- dawki 0,005-0,015 mg/l nie eliminowały cząstek wirusów PVS, PVM i PVY z roślin in vitro ziemniaka
- dawki 0,5-1,5 mg/l nieznacznie zmniejszyły stężenia wirusa PVS w roślinach in vitro ziemniaka
- dawki 0,5-1,5 mg/l nie zmniejszyły stężenia wirusa PVM w roślinach in vitro ziemniaka
- dawki 0,5-1,5 mg/l obniżyły poziom ekstynkcji wirusa PVY wprost proporcjonalnie do stężenia antymetabolitu, nawet o 50%.

Wyniki - badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka

1. Plant Preservative Mixture TM (PPMTM)

- najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne – 93% czystych kultur
- wyższe dawki 0,4 i 0,5% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych

2. ProClin300®

- dawki 0,01-0,02% eliminowały bakterie endogenne w średnio 75% - 85% proporcjonalnie do stężenia
- dawka 0,05% eliminowała bakterie endogenne w 100%. Przy wyższej dawce rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli

Wyniki - badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka

3. Nitrofurazone

- dawki 0,4-0,6% nie miały wpływu na eliminacje zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro

4. Citrosept

- dawka 0,2% to 40% czystych kultur
- dawki 0,3-0,4% działały fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty

5. Azotan srebra (Ag NO₃)

- dawki 0,05-0,15% nie miały wpływu na eliminację zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro, jednocześnie szkodliwie działały na wyszczepione eksplantaty

6. Podchloryn sodu (NaClO)

- najniższe dawki 0,0002-0,001% w ok. 50% eliminował zanieczyszczenia bakteryjne
- wyższe dawki 0,01-0,05% to 100% czystych kultur in vitro ziemniaka.

Wyniki - przebadanie trwałości efektu bakteriobójczego PPM™, ProClin300® w kolejnych pasażach roślin in vitro

Sprawdzając trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów: PPM™ i ProClin 300® na dalszych etapach mikrorozmnażania zaobserwowano, że tylko fragmenty szczytowe były wizualnie czyste, tzn. nie zaobserwowano zmętnienia podłoża. Pozostałe fragmenty były zanieczyszczone bakteriami endogennymi. Jednak pasażując roślinę wyrosłą ze szczytowego fragmentu na podłoże bez biocydu, po kilku dniach wokół eksplantatu pojawiało się wodniste „halo” wskazujące na obecność bakterii endogennych. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin in vitro ziemniaka to maksymalnie 2 pasáže.

Wyniki - sprawdzenie wpływu preparatów bakteriobójczych na tworzenie mikrobulw w procesie mikrotuberyzacji wybranych genotypów ziemniaka.

Mikrobulwy to bulwy ziemniaka uzyskane w procesie mikrotuberyzacji w warunkach in vitro.

- zastosowane biocydy - PPM™, ProClin 300® i podchloryn sodu (NaClO) nie miały istotnego wpływu na wzrost i rozwój mikrobulw.
- na współczynnik rozmnażania mikrobulw decydujący wpływ ma odmiana.

Osiągnięcia

1. termoterapia

- opracowano warunki termoterapii: zoptymalizowano temperaturę i czas trwania, wielkość merystemu
- uwolniono wybrane genotypy ziemniaka od wirusa PVS, PVM i PVY, które są dostępne w banku genów in vitro ziemniaka

2. chemioterapia

- określono skuteczność: rybawiryny, zieleni malachitowej, azacytydyny, tiouracylu w usuwaniu wirusów PVS, PVM i PVY z materiału roślinnego w formie roślin in vitro
- ustalono fitotoksyczności zastosowanych substancji antywirusowych na rośliny in vitro ziemniaka

3. badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka

- określono skuteczność: PPM, ProClin 300®, Nitrofurazone, Citroseptu, azotanu srebra (Ag NO_3), podchlorynu sodu (NaClO) w eliminacji zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro
- ustalono fitotoksyczności zastosowanych biocydów na rośliny in vitro ziemniaka
- ustalono trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin in vitro ziemniaka (max. 2 pasaże).

Opracowane warunki termoterapii są obecnie standardowo stosowane w celu uzyskania zdrowych, wolnych od patogenów roślin ziemniaka wprowadzanych do banku genów in vitro.

Publikacje

1. Sekrecka D., Michałowska D., Krzewińska A. 2014. Zdrowotność zasobów genowych zgromadzonych i udostępnianych z Banku Genów in vitro ziemniaka w Boninie. Ziemiak Polski. 2: 16-19 (5 pk. MEiN)
2. Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Mikrorozmnażanie – technologia wykorzystywana w produkcji zdrowych sadzeniaków ziemniaka. Ziemiak Polski 3: 3-7 (5 pk. MEiN)
3. Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoterapia i chemioterapia – porównanie skuteczności metod w eliminacji wirusów S i M ziemniaka. Ziemiak Polski 4: 10-15 (5 pk. MEiN)
4. Downar-Zapolska J., Sekrecka D. 2017. Metody eliminowania wirusów z roślin ziemniaka – przegląd literatury. Ziemiak Polski 3: 24-31(5 pk. MEiN)
5. Michałowska D., Sekrecka D., Przewodowska A., Piskorz J. 2018. Zwalczenie zakażeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka za pomocą preparatów PPM i ProClin. Ziemiak Polski 3: 43-47 (5 pk. MEiN)
6. Michałowska D., Olejnik O., Salamońska K., Sekrecka D. 2019. Termoterapia jako metoda eliminowania wirusów S i M z roślin ziemniaka w kulturach in vitro. Ziemiak Polski 4: 11-14
7. Michałowska D. 2020. Wpływ preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych na rośliny ziemniaka w kulturach in vitro. Ziemiak Polski 3: 10-16.

Doniesienia konferencyjne

1. Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Eliminacja zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne 48. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 13-15.05.2015: 88-89 (poster)
2. Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoterapia i chemioterapia – skuteczność metod w eliminacji wirusów S i M ziemniaka. Materiały konferencyjne 49. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 11-13.05.2016: 53-54 (poster)
3. Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne 50. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7-9.06.2017: 65 (poster)
4. Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Termoterapia – skuteczność metody w uwalnianiu roślin od wirusa S ziemniaka. Materiały konferencyjne 50. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7-9.06.2017: 63-64 (poster)
5. Michałowska D., Przewodowska A., Buryło P. 2018. Skuteczność stosowania rybawiryny w uwalnianiu roślin od wirusów s i M ziemniaka. Materiały konferencyjne 51. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 6-8.06.2018: 39-40 (poster)
6. Michałowska D., Przewodowska A., Piskorz J., Olejnik O. 2019. Efektywność termoterapii i chemioterapii w uwalnianiu roślin ziemniaka od wirusa S. Materiały konferencyjne. 52. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 22-24.05.2019: 36-37 (wykład)
7. Michałowska D., Przewodowska A., Piskorz J., Olejnik O. 2019. Bakteriobójcze działanie preparatu PPM w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne. 52. Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 22-24.05.2019: 54-55 (poster).