

Lp. w zał.do Rozporządzenia MRiRW; 63

Tytuł zadania: **Eliminacja patogenów niekwarrantannowych (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 niekwarrantannowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro*.

W 2015 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 wirusów, szczególnie wirusa S i M ziemniaka z genotypów gromadzonych w Banku Genów *in vitro*.

Materiał i metody

Termoterapia. Bulwy dwóch odmian; Korona i Tetyda od stycznia do listopada (10 cykli) wysadzano do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczano w fitotronie w temperaturze 37/33⁰C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W.m², z zachowaniem 16 godzinnego fotoperidu. W 5. tygodniu trwania termoterapii pobierano część pąków kątowych i izolowano merystemy. Z każdego genotypu wyizolowano po 100 merystemów. Z pąków wierzchołkowych i bocznych izolowano merystemy wielkości ok. 0,3 mm, a następnie umieszczano w zestalonej agar (0,6%) pożywce MS (Murashige, Skoog, 1962). Probówki z merystemami utrzymywano w fitotronie w optymalnych warunkach dla ich wzrostu i rozwoju tj. 16 godzin na świetle w temperaturze 22⁰C oraz przez 8 godzin w ciemności w temperaturze 20⁰C. Co 7 dni prowadzono obserwacje wyszczepionych merystemów i oceniano ich tempo wzrostu. Dla stymulacji kiełkujące merystemy sukcesywnie przeszczepiano na świeżą pożywkę. Chemioterapię. Rośliny *in vitro* 2 genotypów: Linzer Starke (porażony wirusem S ziemniaka >2,000) i TE-1 (wirus M ziemniaka – 0,918) poddano działaniu antymetabolitów. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS. Do sterylnej pożywki dodano ustalone dawki rybawiryny (RBV)- 10, 15 i 20 mg/l i zieleni malachitowej – 0,02, 0,03 i 0,04 mg/l. Kontrolę stanowiła pożywka bez dodatku antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono w fitotronie w temperaturze 22-20⁰C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m² przez okres 4-5 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro* tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, ulistnienie oraz współczynnik rozmnażania. W 5. tygodniu z każdej kombinacji dwuwęzłowe fragmenty roślin przeszczepiono na pożywkę MS bez dodatku antymetabolitów, następnie wysadzano do szklarni i po kolejnych 4 tygodniach rośliny badano testem DAS ELISA na obecność wirusów.

Wyniki i dyskusja

Procent roślin jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów zwiększał się w zależności od terminu izolowania i był znacznie wyższy w okresie korzystnym dla wzrostu i rozwoju roślin tj. od maja do sierpnia. Izolując małe merystemy (max z 2 zawiązkami), a takie są izolowane z roślin porażonych wirusami, tylko ok. 20% może przeżyć. Uzyskanie zdrowych roślin jest jeszcze trudniejsze i wynosi ok. 10% (w zależności od wirusa). Analiza wariancji danych wykazała istotne różnice między terminami izolowania, brak istotnych różnic pomiędzy badanymi genotypami.

Rybawiryna - RBV dodana do pożywki w dawce 20 mg/l w 100% uzdrowiła wyszczepione eksplantaty porażone wirusem S ziemniaka, ale miała, podobnie jak w 2014 roku, negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Niższe dawki – 10 i 15 mg/l rybawiryny w 60-80% uwolniły badany genotyp od wirusa S ziemniaka i nie miały tak negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Dodatek do pożywki różnych dawek zieleni malachitowej (ZM) nie miał wpływu na eliminację wirusa S ziemniaka z badanego genotypu. Analiza wariancji danych dla roślin *in vitro* porażonych wirusem S ziemniaka wykazała różnice istotne dla zastosowanych antymetabolitów jak i dla dawek. W eliminacji wirusa M ziemniaka zastosowanie rybawiryny i zieleni malachitowej nie miało wpływu na obniżenie ekstynkcji i nie wyeliminowało patogena z badanego genotypu. Wśród chemioterapeutyków stosowanych w chemioterapii roślin rybawiryna zyskała największą popularność ((Faccioli 2001. Zenkteler 1998). Planując badania musimy wziąć pod uwagę to, iż poziom zawartości substancji antywirusowych w pożywce musi być kompromisem pomiędzy skutecznością oddziaływania substancji na wirusy, a jej wpływem na wzrost i rozwój roślin w kulturach *in vitro*. Zbyt wysokie

stężenia substancji antywirusowych może być fitotoksyczne lub hamować regenerację i wzrost kultur. W naszych badaniach wyższa dawka rybawiryny (20mg/l) w 100% uwolniła odmianę Linzer Starke od wirusa S ziemniaka ale jednocześnie negatywnie wpłynęła na wzrost i rozwój roślin. Niższe dawki rybawiryny to mniejszy procent wolnych od wirusa S roślin *in vitro*. W stosunku do wirusa M ziemniaka żadna z badanych substancji nie poradziła sobie z eliminacją tego patogena.

Wnioski

Termoterapia roślin wyrosłych z bulw-matek pozwala na izolację silniejszych merystemów i w rezultacie wyższy procent uzyskanych roślin *in vitro* (średnio 18%)

Najkorzystniejszy termin przeprowadzenia termoterapii i izolowania merystemów to kwiecień-wrzesień

Zastosowane dawki rybawiryny eliminowały wirusa S ziemniaka

Dodanie do pożywki zieleni malachitowej nie miało wpływu na eliminację wirusa S ziemniaka

Skuteczność oddziaływania rybawiryny i zieleni malachitowej dodanej do pożywki na rośliny *in vitro* porażone wirusem M ziemniaka była bardzo niska i nie eliminowała cząstek wirusa

Cytowana literatura

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; Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol.Plant.* 15; 473-479; 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., C.H. Livingston. 1961. The effects of antiviral chemicals on potato virus X. *Am.Potato J.* 38: 294-299; Vasti S.M. 1973. Effect of antiviral chemicals on production of virus X free potato tubers. *Pak.J.Bot.*, 5(2), 139-142; Zenkteler E.K. 1998. Współczesne metody wykrywania i eliminowania drobnoustrojów podczas mikrorozmnażania. *Biotechnologia* 1(40),149-166

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

Cel tematu

Celem tematu w 2015 roku było przebadanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych, stosowanych do ograniczania bakterii u innych gatunków roślin, pod kątem skuteczności zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka bez obawy o ich fitotoksyczność.

Stwierdzono, że nawet największa staranność w procedurze mikrorozmnażania roślin nie daje pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Problem ten spowodował, iż obecnie trudno powiedzieć o kulturach *in vitro* że są sterylne. Prawdopodobnie podczas etapu inicjacji kultury można wprowadzić bakterie endogenne naturalnie zasiedlające tkanki roślinne, które mogą ujawnić się dopiero po wielu miesiącach pasażowania (Orlikowska 2010). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem jak i pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. W związku z tym należy szukać różnych rozwiązań, aby po pierwsze nie wprowadzać bakterii z eksplantatem inicjalnym, a następnie zabezpieczać kultury przed zasiedleniem przez bakterie różnego pochodzenia (Orlikowska,Zawadzka 2006).

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 4 odmian pozyskane z Banku Genów *in vitro* ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano trzy: **Plant Preservative Mixture™ (PPM)**, **ProClin 300®** i **Nitrofurazone (5 Nitro-2furaldehyde-semicarbazone)**. Są one stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych roślin, brak jest natomiast informacji na temat stosowania w kulturach *in vitro* ziemniaka. W naszych badaniach jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS. Preparaty dodano do pożywki MS w 3 stężeniach; PPM™ w stężeniach 0,2; 0,3 i 0,4%, ProClin 300® w stężeniach: 0,005; 0,01 i 0,02%. a Nitrofurazone w stężeniach: 0,2; 0,3 i 0,4 %. Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono w fitotronie w temperaturze 20-18°C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m² przez okres 4 tygodni. Pierwsze obserwacje kultur przeprowadzano po 3 dniach od wyszczepienia eksplantatów. Oceniano obecność bakterii na podstawie pojawiającego się

zmętnienia pożywki pod eksplantatem. Następnie co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro* tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, współczynnik rozmnażania. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach każdorazowo pasażując po 10 eksplantatów na kombinację (4 odmiany x 9 pożywek + kontrola x 4 powtórzenia = 1920 testów). Wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji danych z doświadczenia pojedynczego, 3-czynnikowego w układzie całkowicie losowym.

Wyniki i dyskusja

Badanie miało na celu porównanie kilku preparatów bakteriobójczych i ustalenie reakcji genotypów ziemniaka na dodane do pożywki biocydy. Eksplantaty wyszczepione na pożywkę z PPM™ ładnie rosły i dobrze się korzeniły. Tylko najwyższa dawka PPM™ - 0,4% nieznacznie wpłynęła na wysokość roślin *in vitro* ocenianych genotypów. W oparciu o wyniki z roku 2014, aby uniknąć silnej reakcji roślin na preparat, zastosowano niższe dawki ProClin300® tj. najniższa dawka z roku 2014 była najwyższą w 2015 r. Na kombinacji z dawką 0,02% wyszczepione eksplantaty nieznacznie bieleły w miejscu zetknięcia z pożywką – reakcja fitotoksyczna. Przy najniższej dawce ProClin300® - 0,005% rośliny rozwijały się prawidłowo i były tylko nieznacznie słabsze od roślin kontrolnych. Nitrofurazone (Vitrofurale) dodany do pożywki nie miał negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro* ocenianych genotypów. Rośliny bardzo ładnie się korzeniły i dobrze rozwijały. Oceniane dawki preparatu, w zależności od genotypu, w różnym stopniu wyeliminowały bakterie endogenne z kultur *in vitro* (33-93%). Analiza wariancji danych z doświadczenia pojedynczego, 3-czynnikowego wykazała istotne różnice w badanych preparatach a także pomiędzy zastosowanymi dawkami preparatów. Preparat PPM™ dodany do pożywki MS wykazuje działanie bakteriobójcze. Jednocześnie nie zaobserwowano reakcji fitotoksycznej na zastosowany preparat. Biocyd ProClin300® w 100% wyeliminował z kultur *in vitro* bakterie endogenne, ale przy dawce 0,02% wykazał reakcje fitotoksyczne. Nitrofurazone dodany do pożywki jedynie przy najwyższej dawce w ok. 80% eliminował bakterie endogenne. Należy jednak ocenić preparaty pod kątem ich długotrwałego działania w kolejnych pasażach i sprawdzenie czy bakterie endogenne trwale zostały usunięte z zainfekowanych kultur *in vitro*.

Wnioski

1. PPM™ w badanych dawkach ograniczył zanieczyszczenia bakteryjne w 98-100%
2. Preparat ProClin300® w kulturach *in vitro* ziemniaka w 100% skutecznie eliminował zanieczyszczenia bakteryjne i tylko przy dawce 0,02% nieznacznie wykazał fitotoksyczność
3. Nitrofurazone w zależności od dawki i ocenianego genotypu eliminował bakterie endogenne od 33 do 93% i nie wykazywał fitotoksyczności.
4. Należy sprawdzić trwałość efektu bakteriobójczego w kolejnych pasażach roślin *in vitro*.

Cytowana literatura

Chamberlain, R.E. 1976. Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. J. antimicrob. Chemother., 2, 325-332; Hail Z. Rihan, Mahammed Al-Issawi, Fadil Al-swedi, Michael P. Fuller. 2012. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. Scientia Horticulturae 14, 47-52; Orlikowska T., Zawadzka M. 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. Praca przeglądowa. Biotechnologia 4(75), 64-76; Orlikowska T., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkter E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro*. Praca przeglądowa. Biotechnologia 2(89), 57-71; Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkter 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. J. Horticult. Sci. Biotech 87, 223-230

Prace opublikowane

Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Eliminacja zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka. Streszczenia 48. Konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka”, 88-89 (sprawozdanie z 2014 r. strony 8-10)

Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Mikrorozmnażanie – technologia wykorzystywana w produkcji zdrowych sadzeń ziemniaka. Ziemniak Polski, 3, 3-7.