

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. D. 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 2014 roku w ramach zadania prace badawcze prowadzono w dwóch tematach:

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

#### *Cel tematu:*

Głównym celem tematu badawczego było dopracowywanie metod eliminacji wirusów, szczególnie wirusa S i M ziemniaka z genotypów gromadzonych w Banku Genów *in vitro*. W temacie zaplanowano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów S i M ziemniaka przy pomocy termo- i/lub chemioterapii połączonej z izolacją merystemów.

#### *Materiał i metody*

Rośliny *in vitro* i bulwy wybranych 13 genotypów ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) podzielono na 3 grupy badawcze. I grupę stanowiły rośliny *in vitro* wysadzone do doniczek i poddane termoterapii. II grupa to rośliny uzyskane z wysadzonych bulw i również poddane termoterapii. III grupa badawcza to rośliny *in vitro* poddane chemioterapii. Rośliny *in vitro* (I grupa) na przełomie stycznia i lutego wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po 7 dniach umieszczono w fitotronie w temperaturze 37/33<sup>0</sup>C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W.m<sup>2</sup>, z zachowaniem 16 godzinowego fotoperiodu. Od 2.tygodnia trwania termoterapii, co 7 dni pobierano część pąków kątowych i izolowano merystemy. Rośliny 8 genotypów wyrosłe z bulw (II grupa) poddano termoterapii na przełomie maja i czerwca z zachowaniem parametrów jak przy grupie I. W 5.tygodniu trwania termoterapii wyizolowano po 100 merystemów z każdego genotypu. Przed izolacją merystemów materiał roślinny sterylizowano w 70% etanolu przez 20 sekund, a następnie w 1,5% roztworze chloraminy przez 15 minut. Z pąków wierzchołkowych i bocznych izolowano merystemy wielkości ok. 0,3 mm, a następnie umieszczano w zestalonej agarze pożywce MS (Murashige, Skoog, 1962) z dodatkiem lub bez hormonów wzrostu (kinetyna, giberelina) ewentualnie antymetabolitów (rybawiryne (RBV) w dawce 10 i 20mg/l; zieleń malachitowa (ZM) w dawce 0,02 i 0,04mg/l). Wyłożone do probówek merystemy pozostawiono w fitotronie w optymalnych warunkach dla ich wzrostu i rozwoju (16 h w świetle w temperaturze 22<sup>0</sup>C oraz 8 h w ciemności w temperaturze 20<sup>0</sup>C). Dla stymulacji kiełkujące merystemy sukcesywnie przeszczepiano na świeżą pożywkę. Po 4-8 miesiącach z merystemów uzyskano rośliny *in vitro*. Rośliny *in vitro* z III grupy badawczej poddano działaniu antymetabolitów. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem witamin, glicyny, myo-inozytolu, hydrolizatu kazeiny, sacharozy i agaru. Odczyn pH pożywki ustalono na poziomie 5,8. Podłoże rozlewano do probówek szklanych i wyjaławiano w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu sterylizacji (temperatura 121<sup>0</sup>C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 minut). Do sterylnej pożywki, przy pomocy filtrów strzykawkowych dodano ustalone dawki rybawiryny i zieleni malachitowej. Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono w fitotronie w temperaturze 22-20<sup>0</sup>C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m<sup>2</sup> przez okres 4-5 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro* tj. stopień ukorzenia, wysokość roślin, współczynnik rozmnażania. W 4. tygodniu z każdej kombinacji pobierano po 10 roślin *in vitro* i wysadzano w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4 tygodniach rośliny badano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach każdorazowo pasażując po 30 eksplantatów na kombinację (2400 testów). Wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji. Istotność różnic oceniono za pomocą testu Tukey'a przy p=0,05.

#### *Wyniki i dyskusja*

I grupa badawcza - Reakcja badanych genotypów na zastosowane pożywki oraz czas trwania termoterapii była zróżnicowana. Najwięcej roślin uzyskano z merystemów izolowanych w 3 i 4 tygodniu termoterapii (19,0% - 22,1%), znacznie mniej po 5 i 6 tygodniach działania wysoką temperaturą (9,2%). Z 5 roślin genotypu 1 wyizolowano 245 merystemów, z których wyrosło 18 roślin

*in vitro* (7,35%). Na tak niski procent uzyskanych roślin wpływ miała wielkość izolowanych merystemów (ok.0,3mm) oraz ich izolacja na przełomie stycznia i lutego, czyli w okresie mniej korzystnym dla wzrostu roślin. Wykonano 3-krotną ocenę zdrowotności testem DAS ELISA roślin *in vitro*. W wyniku zastosowanej termoterapii i izolacji merystemów uzyskano 27,8% wolnych od PVS roślin. Dodatek kinetyny i gibereliny do pożywki MS (Murashige, Skoog 1962), na którą wykładano merystemy nie miał istotnego wpływu na liczbę uzyskanych roślin. Z kolei dodanie do pożywki antymetabolitów (rybawiryne lub zieleń malachitowa) spowodowało zamieranie merystemów. Przeprowadzono analizę wariancji danych z doświadczenia dwuczynnikowego, bezpowtórzeniowego i nie uzyskano istotnych różnic między poziomami zarówno dla badanych roślin jak i dla zastosowanych pożywek w teście Tukeya ( $p=0,05$ ).

Termoterapia II grupy - W 5. tygodniu trwania termoterapii z 8 genotypów wyrosłych z bulw-matek wyizolowano po 100 merystemów wielkości 0,1-0,3 mm. Preparowania merystemów dokonano na przełomie maja i czerwca i miało to korzystny wpływ na liczbę otrzymanych roślin *in vitro*. Rośliny wyrosłe z bulw-matek są znacznie silniejsze i łatwiej znoszą terapię wysokimi temperaturami. Procent roślin *in vitro* uzyskanych z wyizolowanych merystemów wynosi średnio 46% (28%-96%). Przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wyników (analiza wariancji danych z doświadczenia dwuczynnikowego, bezpowtórzeniowego), która nie wykazała istotnych różnic między genotypami jak i bulwami wyjściowymi. Pierwsze rośliny *in vitro* z merystemów uzyskano po 100 dniach (ok. 20 września) i obecnie są one sukcesywnie poddawane kontroli zdrowotności. Chemioterapia – III grupa badawcza. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml sterylnej pożywki MS do której dodano rybawiryne (10 i 20 mg/l) albo zieleń malachitową (0,02 i 0,04mg/l). Po 4 tygodniach wzrostu roślin w próbówce zostały one przesadzone do szklarni i przebadane testem DAS ELISA na obecność wirusów S i M ziemniaka. Wyższa dawka rybawiryny - RBV (20 mg/l) dodana do pożywki miała negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro* u badanych genotypów. Rośliny *in vitro* były znacznie słabsze od roślin kontrolnych i bardzo słabo się korzeniły. W przypadku zastosowanych dawek zieleni malachitowej (ZM) nie zauważono negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Jednocześnie wpływ obu antymetabolitów na eliminację cząstek wirusa S i M ziemniaka z roślin był niezadawalający. Ród 10 porażony wirusem S ziemniaka pozytywnie zareagował na dodatek do pożywki zarówno rybawiryny jak i zieleni malachitowej, które wpłynęły na obniżenie poziomu ekstynkcji wirusa S ziemniaka w roślinach. Przeprowadzona analiza wariancji danych z doświadczenia 3-czynnikowego, bezpowtórzeniowego dla roślin *in vitro* porażonych wirusem S ziemniaka i poddanych chemioterapii wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi rodami jak i cyklami badań. Pomiędzy zastosowanymi antymetabolitami nie wykazano istotnych różnic. W przypadku roślin *in vitro* porażonych wirusem M ziemniaka i poddanych chemioterapii uzyskano istotne różnice pomiędzy badanymi genotypami, cyklami badań oraz zastosowanymi antymetabolitami.

#### Wnioski:

- Termoterapia roślin powinna być przeprowadzona na przełomie wiosny i wczesnego lata tj. w okresie korzystnym dla wzrostu roślin.
- Merystemy wyizolowane z wysadzonych roślin *in vitro* są delikatniejsze i uzyskanie z nich roślin jest mniej efektywne (ok. 8%).
- Rośliny wyrosłe z bulw-matek są silniejsze i łatwiej znoszą terapię wysokimi temperaturami. Procent roślin uzyskanych z merystemów jest znacznie wyższy i średnio wynosi 46%.
- Dodatek do pożywki antymetabolitów (rybawiryny i zieleni malachitowej) spowodował zamieranie wyłożonych merystemów.
- Skuteczność oddziaływania rybawiryny i zieleni malachitowej na wirusy S i M ziemniaka była niska i tylko w niewielkim stopniu obniżyła ekstynkcję wirusa w roślinie.

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

Celem tematu 2 w 2014 roku było przebadanie dwóch 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.

#### Material i metody:

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 5 odmian pozyskane z Banku Genów *in vitro* ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano dwa: *Plant Preservative Mixture (PPM<sup>TM</sup>)* i *ProClin 300®*. Oba stosowane są efektywnie w kulturach *in vitro* innych gatunków roślin, brak jest natomiast informacji na temat zastosowania w kulturach *in vitro* ziemniaka.

*Plant Preservative Mixture PPM<sup>TM</sup>* jest biocydem o szerokim spektrum działania i polecanym w hodowli tkanek roślinnych do powszechnego stosowania. Wykorzystywany jest 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®* to biocyd oraz konserwant do odczynników stosowanych w diagnostyce *in vitro*. Przedstawiany jest 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 (Orlikowska i in.2010).

Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* genotypów zanieczyszczonych bakteriami umieszczono w probówkach z pożywką MS. Wybrane do badań preparaty dodano do pożywki MS w dawkach zalecanych przez producenta w 3 stężeniach; *PPM<sup>TM</sup>* w stężeniach 0,05; 0,125 i 0,2%, natomiast *ProClin 300* w stężeniach: 0,02; 0,05 i 0,07%. Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono w fitotronie w temperaturze 20-18°C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m<sup>2</sup> przez okres 4 tygodni. Pierwsze obserwacje kultur wykonano po 3 dniach od wyszczenia 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 ukorzenia, wysokość roślin, współczynnik rozmnażania. Wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji danych z doświadczenia dwuczynnikowego, bezpowtórzeniowego. Istotność różnic oceniano za pomocą testu Tukey'a przy p=0,05.

#### Wyniki i dyskusja:

Reakcja badanych genotypów na zastosowane w pożywce biocydy była bardzo zróżnicowana. Eksplantaty wyszczone na pożywkę z *PPM<sup>TM</sup>* ładnie rosły i dobrze się korzeniły. W 4 tygodniu utrzymywania kultur osiągały ok. 8-10 cm a współczynnik rozmnażania, w zależności od genotypu kształtował się od 5 do 9. Preparat *PPM<sup>TM</sup>* w dawce 0,2% dosyć skutecznie wyeliminował bakterie w kulturach *in vitro*. Skuteczność ta wynosiła 79-92%. Przy niższych dawkach *PPM<sup>TM</sup>* eliminacja bakterii endogennych była słabsza i wahała się w zakresie 15-80% w zależności od genotypu. Z kolei eksplantaty wyłożone na pożywkę z *ProClin300®* już na 2-3 dzień zamierały. W miejscu zetknięcia fragmentu rośliny z pożywką następowało bielenie łodygi i powolne jej zamieranie. Tylko przy najniższej dawce *ProClin300®* (0,02%) z kilku fragmentów wyrosły rośliny *in vitro*, lecz były one słabsze od roślin kontrolnych. *ProClin300®* w dawce 0,05 i 0,07% w 100% wyeliminował bakterie endogenne z kultur *in vitro*, jednocześnie wykazał silną fitotoksyczność w stosunku do ziemniaka. Preparat został wybrany do doświadczenia, gdyż w badaniach dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosta nie był toksyczny i był wg Orlikowskiej i in.(2010) bardzo obiecujący. W stosunku do roślin ziemniaka okazał się bardzo fitotoksyczny i nie może być polecany do stosowania. Analiza wariancji danych z doświadczenia wykazała istotne różnice pomiędzy preparatami. Nie wykazano natomiast istotnych różnic pomiędzy ocenianymi genotypami.

#### Wnioski:

- *PPM<sup>TM</sup>* w zależności od zastosowanej dawki ogranicza występowanie zanieczyszczeń bakteryjnych w 15-92%. Nie wykazuje fitotoksyczności w stosunku do roślin ziemniaka.
- Preparat *ProClin300®* w kulturach *in vitro* ziemniaka prawie w 100% skutecznie eliminował zanieczyszczenia bakteryjne. Wykazuje bardzo wysoką fitotoksyczność i powoduje zamieranie eksplantatów ziemniaka.

#### Cytowana literatura:

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol.Plant.* 15; 473-479.

Orlikowska T., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkeler E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro*. *Praca przeglądowa Biotechnologia* 2(89), 57-71

#### Prace opublikowane:

Sekrecka D., Michałowska D., Krzewińska A. 2014. Zdrowotność zasobów genowych zgromadzonych i udostępnianych z Banku Genów *in vitro* ziemniaka w Boninie. *Ziemniak Polski* 2, 16-19.