



ELIMINACJA PATOGENÓW NIEKWARRANTANNOWYCH (BAKTERIE ENDOGENNE I WIRUSY) ORAZ KONTROLA ZDROWOTNOŚCI ROŚLIN ZIEMNIAKA W BANKU *IN VITRO*.

D. Michałowska, A. Przewodowska, W. Przewodowski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Boninie

76-099 Bonin

michalowska@ziemniak-bonin.pl

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

W ramach tematu badawczego w 2018 roku zaplanowano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów PVS, PVM i PVY ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z hodowlą tkanek merystematycznych i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Termoterapia

Materiał i metody

Bulwy dwóch odmian: Latest 16-159 porażona wirusem PVM oraz Leonata z wirusem PVS, wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w komorze termoterapijnej. Przez okres 4-5 tygodni rośliny poddane zostały działaniu wysokiej temperatury: 37°C w dzień i 33°C w nocy. W 5 tyg. trwania termoterapii pobrano z roślin pąki kątowe i szczytowe, z których następnie izolowano merystemy (0,1-0,4 mm) - wyizolowano ok. 200 merystemów. Pąki kątowe zostały podzielone między dwóch wykonawców.

Wyniki

Procent otrzymanych roślin *in vitro*, w tym roślin uwolnionych od wirusa jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów był zależny m.in. od wykonawcy (tab.1.). Z odmiany zainfekowanej wirusem PVM w zależności od wykonawcy uzyskano od 26,4% do 16% zdrowych roślin *in vitro*. Większy problem w uwalnianiu stwarza wirus PVS ziemniaka, dlatego izolowano w miarę możliwości tylko kopułę merystematyczną. W zależności od wykonawcy uzyskano od 16,2% do 8% roślin wolnych od wirusa PVS ziemniaka (tab.1.).

Chemioterapia

Materiał i metody

Rośliny *in vitro* 5 odmian tj. Linzer Starke, Eugenia (PVS), TE-1, Giewont (PVM) i EF 55-8545 (PVY), u których testem DAS ELISA stwierdzono wysokie porażenie wirusami poddano działaniu dwóch substancji antywirusowych: rybawiryna i tiouracyl. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS (Murashige, Skoog) zestalonej agarą (0,4%) z dodatkiem rybawiryny (30, 40 i 50 mg/l) lub tiouracylu (0,005; 0,010 i 0,015 mg/l). Kontrolę stanowiły fragmenty rośliny wyszczone na pożywkę bez dodatku antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16 godz. dzień w temp. 22°C, oświetleniu 8 W·m² i 8 godz noc w ciemności w temp. 20°C przez okres 3-4 tygodni. 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.

Wyniki

Rybawiryna dodana do podłoża w dawce 30 i 40 mg/l nieznacznie obniżyła poziom ekstynkcji wirusa PVS i silnie obniżyła poziom PVY ziemniaka w roślinach *in vitro* (tab.2.). Jednocześnie jej fitotoksyczne działanie na rozwój roślin *in vitro* było wprost proporcjonalne do stężenia (fot.1.). 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 (fot.2.). W eliminacji wirusa PVM ziemniaka zastosowana rybawiryna nie miała wpływu na obniżenie poziomu ekstynkcji. Z kolei dodatek do pożywki różnych dawek tiouracylu nie miał wpływu na eliminację zarówno wirusa PVS i PVM ziemniaka z badanych odmian, tylko obniżył ekstynkcję wirusa PVY. Eksplantaty wyszczone na podłoże z dodatkiem tiouracylu rozwijały się prawidłowo i dobrze korzeniły się (fot.3.).

Tabela 2. Poziom ekstynkcji wirusów w roślinach po zastosowaniu chemioterapii (średnia z 3 cykli).

wirus	kontrola	RBV 30	RBV 40	RBV 50	TIO 0,005	TIO 0,010	TIO 0,015
PVM 1	0,392	0,612	0,435	-	0,517	0,363	0,504
PVM 2	0,390	0,561	0,483	-	0,373	0,372	0,227
PVS 1	1,225	0,608	0,130	-	1,106	1,135	1,267
PVS 2	1,305	0,648	0,146	-	1,360	1,146	1,508
PVY	3,384	0,256	0,123	-	0,324	0,083	0,318



Fot.1. Reakcja roślin na rybawirynę (40 mg/l).



Fot.2. Reakcja roślin na rybawirynę (50 mg/l).



Fot.3. Reakcja roślin na tiouracyl (0,015 mg/l).

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

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 4 odmian: Finezja, Gawin, Harpun i Michalina pozyskane z banku genów *in vitro* ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiano na pożywkę MS (Murashige, Skoog) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych w następujących stężeniach: Plant Preservative Mixture (PPM™): Kontrola; 0,3%; 0,4% ; 0,5%; ProClin300® - Kontrola; 0,02%; 0,03%; 0,04% i azotan srebra (AgNO₃) – Kontrola; 0,05%; 0,1%; 0,15%. Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16/8. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano trzeciego dnia po wyszczeniu eksplantatów. Do 7 dnia dokładnie można zaobserwować wystąpienie mgiełek, 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.

Dodatkowo sprawdzono trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów: PPM™, ProClin 300® na dalszych etapach mikrorozmnażania.

Wyniki

W 2018 roku w zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do podłoża preparat PPM™, podobnie jak w latach poprzednich nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty, a nawet najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne - 78,35%. Wyższe dawki – od 0,4% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych (tab.3.). Również dodatek do pożywki ProClin300® eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 100% przy zastosowaniu najwyższej dawki i w 86,67% przy zastosowaniu niższej dawki (tab.3.). Jednocześnie przy niższych dawkach nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tylko przy najwyższej dawce 0,04% rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli. Azotan srebra (AgNO₃) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian (tab. 3.). Dodatkowo szczepione fragmenty roślin *in vitro* zareagowały na azotan srebra, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobiulkami .

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.

Tabela 3. Procent kultur *in vitro*, w których wizualnie nie stwierdzono bakterii endogennych w zależności od zastosowanej dawki biocydu (średnia z 4 cykli).

biocyd	dawka	% „czystych” kultur <i>in vitro</i> w odmianach				
		Finezja	Gawin	Harpun	Michalina	średnia
PPM™	0	48,4	23,8	52	16,9	35,28
	0,3	100	60	66,7	86,7	78,35
	0,4	100	100	100	100	100
	0,5	100	100	100	100	100
ProClin300®	0	43,3	30,1	58,9	20,5	38,2
	0,02	100	86,7	100	86,7	93,35
	0,03	100	80	86,7	80	86,67
	0,04	100	100	100	100	100
AgNO ₃	0	45,57	46,9	30	16,9	34,84
	0,005	13,3	0	13,3	0	6,65
	0,01	13,3	6,7	20	0	10
	0,015	53,3	6,7	20	6,7	21,67