

## METODY ELIMINOWANIA WIRUSÓW Z ROŚLIN ZIEMNIAKA – PRZEGLĄD LITERATURY

### METHODS FOR ELIMINATION OF VIRUSES FROM POTATO PLANTS – LITERATURE REVIEW

mgr inż. Joanna Downar-Zapolska, inż. Danuta Sekrecka  
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

#### Streszczenie

Termoterapia połączona z kulturą merystemów to długotrwałe traktowanie temperaturą 35-45°C roślin lub eksplantatów w celu aktywacji genów wyciszających wirusy. Następnie izoluje się merystemy, stanowiące „odnawialne” źródło komórek zdolnych do dyferencjacji w liście, pędy boczne, kwiatostany czy korzenie boczne. Im mniejszy eksplantat, tym wyższy procent roślin uwolnionych od wirusów. Chemioterapia – dodanie antymetabolitów (rybawiryny, tiouracylu, zieleni malachitowej, azacytydyny, kwasów: salicylowego, benzoowego, jasmonowego, linolowego i in.) do pożywki, na której prowadzi się kulturę merystemów lub fragmentów jednowęzłowych. Skuteczność chemioterapii w połączeniu z innymi metodami jest wysoka. Elektroterapia – podłączenie elektrod źródła impulsów pola elektrycznego bezpośrednio do pędu ziemniaka lub pośrednio do komory elektroforetycznej wypełnionej roztworem NaCl, w którym zanurzone są umyte fragmenty pędu zainfekowanej rośliny z kilkoma pąkami bocznymi. Zwiększanie wartości natężenia prądu oraz połączenie elektroterapii z chemioterapeutykami wpływa na wzrost skuteczności. Krioterapia – traktowanie merystemów wierzchołkowych temperaturą -196°C przez zanurzenie w ciekłym azocie w czasie krótszym niż podczas kriokonserwacji. Eliminacja wirusów następuje w wyniku nieodwracalnego uszkodzenia porażonego materiału – komórek otaczających kopułę merystemu i załączki liścieni, które są mniej odporne na niską temperaturę.

**Słowa kluczowe:** chemioterapia, elektroterapia, krioterapia, termoterapia, ziemniak

#### Abstract

Elimination of viruses is usually based on thermotherapy combined with the meristem culture. Thermotherapy is a long-term treatment of plants or explants at 35-45°C to activate virus-silencing genes. Then, meristems are isolated, forming a "renewable" source of cells capable of differentiating into leaves, lateral shoots, inflorescences or lateral roots. The smaller the explant, the higher the percentage of plants released from viruses. Another approach, chemotherapy consists of the addition of anti-metabolites (ribavirin, thiouracil, malachite green, azacitidine, acids: salicylic, benzoic, jasmonic, linoleic, etc.) to the medium for meristem culture or single nodal segments culture. The efficacy of chemotherapy in combination with other methods is high. Electrotherapy is based on connecting the electrodes of the source of the electric field pulses directly to the potato shoot or indirectly into the electrophoretic chamber filled with NaCl solution, in which fragments of the infected plant with a few buds are immersed. Increasing current and combining electrotherapy with chemotherapeutics have a positive impact on the efficacy of a virus elimination. Cryotherapy is a treatment of apex meristems at -196°C by immersion in liquid nitrogen for a shorter time than required for cryopreservation. Virus elimination occurs as a result of irreversible damage to the infected material - cells surrounding the meristem and the cotyledon, which are less resistant to low temperatures.

**Keywords:** chemotherapy, cryotherapy, electrotherapy, potato, thermotherapy

**O**pisano 16 wirusów porażających ziemniaki w Europie (Chrzanowska, Waś 1993), a także 13 wirusów, które mogą wywołać nekrozy na bulwach lub wewnątrz bulw (Chrzanowska 1993). Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy powodują degenerację i znaczne straty plonu (Gabriel 1989). Według Kowalskiej-Noordam

(1989) ze względu na zakres i częstotliwość występowania można wymienić następujące wirusy: wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), wirus liściozwoju ziemniaka (*Potato leafroll virus*, PLRV), wirus M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) i wirus S ziemniaka (*Potato virus S*, PVS).

Największe zagrożenie dla ziemniaka w Polsce stanowi PVY, a efektem porażenia może być spadek plonów o ok. 50% (Chrzanowska 2000). Także wirusy M i S, które łatwo się rozprzestrzeniają, powodują straty do 30% (Kostiw 2013). Rzadko i lokalnie pojawiają się infekcje ziemniaka wywołane przez PVX (Chrzanowska 2000). Natomiast PVA jest powszechnie występującym wirusem m.in. w Chinach (Yang 2014), jednakże w Polsce ma niewielkie znaczenie (Kowalska-Noordam 1989).

Wirusy stanowią poważne zagrożenie dla hodowli ziemniaka, gdyż liczba chorych roślin wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a w przeciwieństwie do innych mikroorganizmów chorobotwórczych, do tej pory nie ma skutecznych metod ich zwalczania w polu. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001) i utrzymywanie zdrowego materiału w kulturach *in vitro*.

Przed przygotowaniem materiału roślinnego do terapii wykonywane są badania na obecność wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka (PSTVd) i bakterii powodujących bakteriozę pierścieniową (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) oraz śluzaka (*Ralstonia solanacearum*). Te trzy patogeny są uznawane za kwarantannowe. Genotypy ziemniaka zainfekowane ww. patogenami nie są poddawane terapii, a porażone bulwy się utylizuje (Sekrecka, Michałowska 2013). Obecność wirusów jest sprawdzana za pomocą powszechnie w Polsce stosowanego testu immunoenzymatycznego DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) i/lub reakcji polimerazy łańcuchowej z odwrotną transkryptazą RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) (Yang i in. 2014, Nasir 2010). Do uzyskania zdrowego materiału wyjściowego wykorzystuje się kilka technik: kulturę merystemów, termoterapię, krioterapię, chemioterapię i elektroterapię.

### Termoterapia i kultura merystemów

Najczęściej praktykowanym sposobem eliminowania wirusów jest termoterapia połączona z kulturą merystemów (Panattoni i in. 2013). Termoterapia polega na długotrwałym traktowaniu podwyższoną temperaturą (35-45°C) roślin lub eksplantatów (Malepszy 2001). W wyniku działania wysokiej temperatury następuje aktywacja genów wyciszających wirusa.

Po termoterapii izoluje się merystemy, które są zbudowane z komórek macierzystych mających zdolność szybkiego odtwarzania samych siebie oraz formowania określonych tkanek i organów. Dzięki temu stanowią „odnawialne” źródło komórek zdolnych do dyferencjacji w liście, pędy boczne, kwiatostany czy korzenie boczne (Majewska-Sawka 2012). Merystemy nie mają połączenia z systemem naczyniowym rośliny, za pomocą którego rozprzestrzeniają się wirusy. Dlatego też po ich wypreparowaniu otrzymuje się eksplantaty o najniższej koncentracji patogenów (Panattoni 2013).

Aby otrzymać kulturę merystemów, najpierw pobiera się fragmenty pędu z pąkami bocznymi i kątowymi (Zaklukiewicz 1971, Brown i in. 1988). Po ich odkażeniu w sterylnych warunkach przystępuje się do izolowania merystemów pod mikroskopem za pomocą skalpela i igły preparacyjnej (Lizarga i in. 1991). Po wypreparowaniu merystemy regenerują się przez kilka miesięcy; według Aliego i innych (2013) dwa miesiące, a według Brown i innych (1988) – cztery. Istnieje także metoda, w której najpierw preparuje się merystemy z zainfekowanych roślin, a dopiero gdy wyrosną z nich rośliny *in vitro*, przeprowadza się termoterapię (Biniam, Tedesse 2008).

Na podstawie danych przedstawionych w tabeli 1 zaobserwowano korelację między wielkością merystemów a skutecznością eliminacji wirusów z roślin ziemniaka za pomocą termoterapii połączonej z kulturą merystemów – im mniejszy eksplantat, tym wyższy procent roślin uwolnionych od wirusów.

Tabela 1

**Wpływ wielkości wyizolowanych merystemów na skuteczność eliminacji wirusów za pomocą termoterapii połączonej z kulturą merystemów (na podstawie danych z literatury)**

Literatura	Wielkość merystemu (mm)	Skuteczność* (%)	Wirus	Czas termoterapii (tyg.)	Przedmiot termoterapii
Stance-Smith, Melor 1968	0,3-0,5 0,6-1 <1	35, 18 38, 13 0	PVX, PVS	2-4	rośliny
Zaklukiewicz 1983	0,1-0,2 0,2-0,4 0,4-1	100 60 18	PVX, PVY, PVM	2-4	rośliny
Brown i inni 1988	0,05-0,2	90	PVS	3-7	rośliny in vitro
AlMaarri i inni 2012	0,1 0,2 0,3	81 75 68	PVY	6	rośliny in vitro

\* procentowa zawartość roślin wolnych od wirusa, otrzymanych po termoterapii połączonej z kulturą merystemów

Liczba roślin wolnych od wirusa rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem temperatury oraz czasem trwania termoterapii (Stance-Smith, Melor 1968; Biniam, Tedesse 2008) – tabela 2. Jednocześnie zmniejsza się licz-

ba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Zapata i in. 1995, Ali i in. 2013) – tabela 2.

Tabela 2

**Wpływ temperatury i czasu trwania termoterapii na stopień regeneracji roślin i skuteczność eliminacji wirusów z roślin in vitro ziemniaka, wg danych z literatury**

Literatura	Czas trwania termoterapii (tyg.)	Temperatura termoterapii (°C)	Regeneracja* (%)***	Skuteczność** (%)***	Wirus	Przedmiot termoterapii
Stance-Smith, Melor 1968	2-4 6-8 10-12	33-37	39 40 29	a)19, b)9 a)45, b)16 a)79, b)18	a)PVX, b)PVS	rośliny
Zaklukiewicz 1982	2-4	16-22 33-37	13 7	8 92	PVM, PVS	rośliny
Zapata i inni 1995	4	26 33-35	61 47	28, 5, 53 30, 77, 90	PVX, PVY, PVS	rośliny in vitro
Biniam, Tedesse 2008	1 2 3	37	45 36 0	86, 100, 83 25, 100, 100 ---	PVX, PVS, PLRV	rośliny in vitro
Ali i inni 2013	brak danych	27 30 35	21 19 18	15 39 44	PVY	rośliny in vitro

\* procentowa liczba roślin, które zregenerowały się po terapii; \*\* procentowa liczba wolnych od wirusa roślin ziemniaka, otrzymanych po termoterapii połączonej z kulturą merystemów; \*\*\* wartości zaokrąglono do całości

### Chemioterapia

Polega na dodaniu antymetabolitów do pożywki, na której prowadzi się kultury merystemów lub fragmentów jednowęzłowych. Antymetabolity są to analogi nukleotydów o wysokiej aktywności przeciwwirusowej, włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym, hamując tym samym ich namnażanie (Malepszy 2001).

Najczęściej wymienianymi chemioterapeutykami w literaturze są: rybawiryna, tiouracyl i zieleń malachitowa. Norris (1954) oraz Oshima i Livingstone (1961) zaobserwowali, że po zastosowaniu zieleni malachitowej zmniejsza się koncentracja PVX. Z drugiej strony Vasti (1973), Manzer (1958) i Thomson (1956) wykazali, że dodatek tego barwnika nie ma istotnego wpływu na koncentrację PVX lub PVY. Z kolei tiouracyl w ocenie Vastiego (1973) i Manzera (1958) był skuteczniejszym antymetabolitem, gdyż pozwolił na uwolnienie większej ilości materiału

roślinnego od wirusów niż zieleń malachitowa.

Kolejnym antymetabolitem stosowanym w chemioterapii roślin *in vitro* ziemniaka jest rybawiryna. Z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, w szczególności w połączeniu z innymi terapiami, np. termoterapią (Nasir i in. 2010, Mahmoud i in. 2009, Avan i in. 2007). Na podstawie danych z literatury wywnioskowano, że wraz ze zwiększaniem wartości stężenia rybawiryny w pożywce następuje proporcjonalny wzrost liczby roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii (tab. 3). Jednocześnie odnotowuje się zmniejszenie liczby roślin zdolnych do regeneracji (Wumbugu i in. 1985; Nasir i in. 2010; Klein, Livingstone 1983; Mahmoud i in. 2009) – tabela 3. Spowodowane jest to fitotoksycznością rybawiryny, zwłaszcza w wysokich stężeniach (Klein, Livingstone 1983; Yang i in. 2014) – tabela 3.

Tabela 3

#### Wpływ stężenia rybawiryny na stopień regeneracji roślin i skuteczność eliminacji wirusów z roślin *in vitro* ziemniaka, wg danych z literatury

Literatura	Przedmiot chemioterapii	Terapie dodatkowe	Regeneracja* (%)***	Skuteczność** (%)***	Dawka rybawiryny (mg/l)	Wirus
Wambugu i inni 1985	kultura merystemów	brak	90 80 40	70 80 90	5 10 20	PVY, PVS
Nasir i inni 2010	kultura fragmentów pędu	brak	spadek	35-45	30-50	PVY
		termo-terapia	spadek	50-60		
	kultura merystemów	termo-terapia	spadek	70-80		
Klein, Livingstone 1983	rośliny in vitro	brak	93 42 23 0	0 90 100 0	10 20 30 40	PVX, PVS
Mahmoud i inni 2009	kultura merystemów	brak	26-33	30-43	20	PVY
		elektro-terapia	33-24	66-100		
Awan i inni 2007	kultura fragmentów pędu	brak	51-64	32-41	20-40	PLRV
		termo-terapia	35-32	51-64		
	kultura merystemów	termo-terapia	35-32	69-93		

Literatura	Przedmiot chemioterapii	Terapie dodatkowe	Regeneracja* (%)***	Skuteczność** (%)***	Dawka rybawiryny (mg/l)	Wirus
Zapata i inni 1995	kultura fragmentów pędu	brak	61	1) 32,57 2) 40,43 3) 50,85	40,80	1)PVX 2)PVY 3)PVS
		termoterapia	53	1) 42,33 2) 40,43 3) 98,87		
Yang i inni 2014	kultura pąków bocznych	brak	50-100 50-100 33-100 0-50	100 60-100 60-100 100	75, 100 150 200	PVX,PVS PVA, PLRV, PVY
AlMaarri i inni 2012	kultura merystemów	brak	87-100 93-96 75-97	56-81 75-87 75-87	10 20 30	PVY

Objaśnienia – patrz tabela 2

Do eliminowania wirusów z roślin ziemniaka w warunkach *in vitro* oprócz rybawiryny wykorzystuje się inne chemioterapeutyki, m.in. azacytydynę, której skuteczność, w połączeniu z kulturą merystemów i termoterapią, wynosi 81% w przypadku PVX i PLRV (Nasir i in. 2010, Awan i in. 2007). Po dodaniu do pożywki kwasów: salicylowego, benzoowego, jasmonowego, linolowego Abou-Zeid (2007) otrzymał 67-97% roślin wolnych od TRSV (*Tobacco ringspot virus*). W wyniku połączenia deazaurydyny i termoterapii uzyskano 50% zdrowego materiału wyjściowego – bez PVY (Nascimento i in. 2003). Dodanie przez Badarau i innych (2014) oseltamiwiru do pożywki z rybawiryną oraz wykorzystanie elektroterapii podwyższyło skuteczność eliminacji PVY do 84%. Zastosowanie przez Bittera i innych (1987) DHT (dihydrotestosteron) jako chemioterapeutyka spowodowało uwolnienie roślin ziemniaka od PVX w 100%. Natomiast w

wyniku połączenia rybawiryny z DHT Faccioli i Colombarini (1996) otrzymali ok. 70% roślin wolnych od PVM i PVS.

#### Elektroterapia

Polega na podłączeniu elektrod źródła impulsów pola elektrycznego (o różnym zakresie wartości natężenia) bezpośrednio do pędu ziemniaka lub pośrednio do komory elektroforetycznej wypełnionej roztworem NaCl, w którym zanurzone są umyte fragmenty pędu zainfekowanej rośliny z kilkoma pąkami bocznymi (Mahmoud i in. 2009).

W większości przypadków wraz ze wzrostem wartości natężenia prądu rośnie skuteczność eliminowania wirusów (Saldana i in. 1996, Mahmoud i in. 2009, Shambhu i in. 2008, Meyboudi i in. 2011) – tabela 4. Połączenie elektroterapii z chemioterapeutykami skutkuje wzrostem efektywności terapii (Mahmoud i in. 2009, Shambhu i in. 2008, Badarau i in. 2014).

Tabela 4

#### Wpływ elektroterapii na stopień regeneracji i skuteczność eliminowania wirusów z roślin *in vitro* ziemniaka, wg danych z literatury

Literatura	Terapie dodatkowe	Czas elektroterapii (min)	Natężenie (mA)	Regeneracja* (%)***	Skuteczność** (%)***	Wirus
Lozoya-Saldana i inni 1996	brak	a) 5 b) 10	5,10,15	a) 25, 87, 88 b) 65, 58, 79	a) 0, 14, 66 b) 0, 61, 47	PVX
Mahmuond i inni 2009	brak	a) 5 b) 10	5,10,15	a) 48, 57, 63 b) 50, 56, 24	a) 47, 65, 69 b) 57, 73, 83	PVY



Literatura	Terapie dodatkowe	Czas elektroterapii (min)	Natężenie (mA)	Regeneracja* (%)***	Skuteczność** (%)***	Wirus
	chemioterapia			a) 34, 31, 25 b) 33, 28, 24	a) 67, 80, 100 b) 70, 88, 100	
Shambhu i inni 2008	brak	5	10	63	40,47	PVY, PLRV
	chemioterapia			73	63,67	
Meyboudi i inni 2011	brak	a)10 b)20	15,25,35	a) 63, 75, 67 b) 58, 50, 46	a) 0,0,8 b) 0,0,13	PVA, PVY

Objaśnienia – patrz tabela 2

### Krioterapia

Polega na traktowaniu merystemów wierzchołkowych bardzo niską temperaturą (-196°C) przez zanurzenie w ciekłym azocie w czasie krótszym niż podczas kriokonservacji (Wang i in. 2009, Engelmann 2011). Eliminacja wirusów następuje w wyniku nieodwracalnego uszkodzenia porażonego materiału – komórek otaczających kopułę merystemu i załączki liścieni, które są mniej odporne na niską temperaturę, gdyż są bardziej uwodnione i zawierają większe komórki, wakuole oraz rzadszą cytoplazmę (Wang 2009, Bolekurova 2010).

Według Wanga (2006) materiał roślinny wolny od PRLV i PVY otrzymuje się za pomocą trzech technik: 1. zamrażania kapsułkowanych eksplantatów połączonego z dehydratacją lub 2. witrifikacją oraz 3. tzw. zamrażania kropelek (ultraszybkie zamrażanie). Zamrażanie kapsułkowanych eksplantatów połączone z dehydratacją jest oparte na technologii produkcji sztucznych nasion. Materiał roślinny jest zamykany w specjalnych kapsułkach, chroniących eksplantat przed mechanicznym uszkodzeniem. Tak przygotowane kapsułki są suszone w komorze z laminarnym przepływem i zamrażane w ciekłym azocie (Kaczmarczyk i in. 2011, Kryszczuk 2002).

Kapsułkowanie eksplantatów połączone z witrifikacją polega na tym, że kapsułki z merystemami po inkubacji w roztworze krioprotektantów (związków chemicznych mających za zadanie zminimalizowanie szkodliwego wpływu zamrażania i rozmrażania) są poddawane procesowi witrifikacji – zeszkleniu uwodnionej tkanki z ominięciem procesu krystalizacji. Wówczas nie tworzą się kryształy lodu, które mechanicznie mogłyby

uszkodzić tkankę roślinną (Kaczmarczyk i in. 2011, Kryszczuk 2002).

W metodzie zamrożonych kropelek eksplantaty przed zanurzeniem w ciekłym azocie są traktowane krioprotektantami w stężeniu niższym niż podczas witrifikacji (Kryszczuk 2002, Kaczmarczyk 2011).

Badania Flecher P. i Flecher J. (2011) potwierdziły, że koncentracja PVY i PVX zmniejszyła się po zastosowaniu krioterapii. Także Wang i inni (2006) zaobserwowali większą skuteczność zwalczania PLRV i PVY (powyżej 80 i 90%, odpowiednio) w porównaniu z termoterapią połączoną z izolacją merystemów.

Problemem w stosowaniu techniki krioterapii jest zróżnicowana regeneracja merystemów, czasami stosunkowo niska, zależnie od gatunku i genotypu (Dhital i in. 2009).

### Metody eliminowania wirusów w banku genów in vitro w Boninie

Materiałem wyjściowym do wprowadzenia genotypu do banku są bulwy nowych odmian z kolekcji polowych i rodów perspektywicznych uzyskanych od hodowcy. Część stolonowa każdej bulwy jest badana na obecność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* oraz *Ralstonia solanacea*. Testy wykonuje się metodą pośredniej immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał polii i monoklonalnych. Materiał wolny od ww. patogenów poddawany jest termoterapii. Przez 4-8 tygodni rośliny rosną w fitotronie w temperaturze 35-37°C i oświetleniu ok. 55 Wm<sup>-2</sup> (fot. 1). W 3. tygodniu wzrostu są testowane na obecność PSTVd – testem PCR oraz wirusów ziemniaka – testem ELISA. Od 4. tygodnia z odkażonych pąków bocznych i kątowych pod mikroskopem, za pomocą igły preparacyjnej i skalpela, są izolowane mery-

stemy. Eksplantaty wykłada się na pożywkę z dodatkiem kinetyny i gibereliny i umieszcza w fitotronie w temperaturze 18-20°C, przy dobowym cyklu dzień/noc 16/8 godz. Po 2-5 miesiącach z merystemów otrzymuje się rośliny *in vitro*, wyrównane fenotypowo i ge-

netycznie stabilne (Sekrecka, Michałowska 2013). Obecnie prowadzone są badania nad skutecznością chemioterapii z wykorzystaniem m.in. rybawiryny (fot. 2), zieleni malarzowej i azacytyny.



Fot. 1. Fitotron do termoterapii roślin ziemniaka (fot. D. Sekrecka)



Fot. 2. Wpływ rybawiryny (RBV) na wzrost i rozwój roślin *in vitro* (fot. D. Sekrecka)

#### Literatura

**1. Abou-Zeid A. 2003.** Biological, biochemical, serological, and tissue cultural studies on an Egyptian isolate of Tobacco ringspot virus infecting potato plants. – Arab. J. Biotech. 6(1): 153-167; **2. Ali M. A., Nasiruddin K. M., Haque M. S., Faisal S. M. 2013.** Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. – SAARA J. Agri. 11(1): 71-80; **3. AlMaarri K. Al., Mass R., AlBiski F. 2012.** Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. – Plant Biotech. 29: 237-243; **4. Awan A. R., Mughal S. M., Iftikhar Y., Khan H. Z. 2007.** *In vitro* elimination of Potato Leaf Roll Polerovirus from potato varieties. – Eur. J. Sci. Res. 18 (1): 155-164; **5. Badarau L. C., Chiru N., Guta I. C. 2014.** Effect of some chemio- and electrotherapies on potato virus V and X infected *Solanum tuberosum* L. plantlets (cv. Roclas). – Potato Res. 57: 145-181; **6. Biniam T., Tedesse M. 2008.** A survey of Vidal status on potatoes grown in Eritrea and *in vitro* elimination of local variety 'Tsaeda embaba'. – Afr. J. Biotech. 7 (4): 397-403; **7. Bitter H., Schenk G., Schuster G. 1987.** Chemiotherapeutical elimination of potato virus X from potato stem cuttings. – J. Phytopathol. 120: 90-92; **8. Bolekurova V. B. 2010.** Methods of Biotechnology in system of efforts aimed at plant biodiversity preservation (Review). – Cytol. Genet. 44: 174-185; **9. Brown C. R., Kwiatkowski S., Martin M. W., Thomas P. E. 1988.** Eradication of PVS from potato clones through excision of

meristems from *in vitro* heat-treated shoot tips. – Am. Potato Res. 65: 633-638; **10. Chrzanowska M. 1993.** Wirusy wywołujące nekrozy bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.). – Biul. Inst. Ziemn. 43, 25-34; **11. Chrzanowska M. 2000.** Choroby ziemniaka wywoływane przez wirusy. – Wieś Jutra 3(20): 27-29; **12. Chrzanowska M., Waś M. 1993.** Wirusy wykryte w ziemniaku (*Solanum tuberosum* L.) i opisane dotychczas w literaturze światowej. – Biul. Inst. Ziemn. 42, 87-95; **13. Dhital S. P., Manandhar H. K., Lim H. T. 2009.** Preservation of *in vitro* grown shoot of potato (*Solanum tuberosum* L.) by different methods of cryopreservation. – Nepal J. Sci. Tech. 10: 15-20; **14. Engelmann F. 2010.** Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. – In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 47: 5-16; **15. Faccioli G. 2001.** Control of potato viruses using meristem and stem- cuttings cultures, thermotherapy, chemotherapy. [In:] Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. (eds G. Loebenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. Lawson. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht: 365-390; **16. Faccioli G., Colombarini A. 1996.** Correlation of potato virus S and virus M contents of potato meristem tips with the percentage of virus-free plantlets produced *in vitro*. – Potato Res. 39: 129-140; **17. Fletcher P., Fletcher J. 2011.** The eradication of virus and like organisms from potato using cryotherapy. [In:] Book of Abstr. 4th Conf. International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), Antequera, Malaga, Spain, 17-20 May

- 2011: 105; **18. Gabriel W. 1989.** Epidemiologia chorób wirusowych ziemniaka. PWN Warszawa: 11-14; **19. Kaczmarczyk A., Rokka V-M., Keller J. E. R. 2011.** Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review. – Potato Res. 54: 45-79; **20. Klein R. E., Livingston C. H. 1983.** Eradication of Potato Virus X i S Potato Shoot-tip Culture with ribavirin. – Phytopathology 73(7): 1049-1050; **21. Kostiw M. 2013.** Przyrodnicze i pozaprzyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. – Wieś Jutra 1(174): 28-29; **22. Kowalska-Noordam A. 1989.** Charakterystyka wirusów ziemniaka. [W:] Epidemiologia chorób wirusowych ziemniaka. Red. W. Gabriel. PWN Warszawa: 30-50; **23. Kryszczuk A. 2002.** Kriokonserwacja – nowoczesna metoda długotrwałego przechowywania materiału. – Biul. IHAR 223/224: 57-65; **24. Lizarraga R., Panta A., Jayasinghe U., Dodds J. 1991.** Tissue Culture For Elimination Of Pathogens. CIP Res. Guide 3; **25. Lozoya-Saldana H., Abello F. J., Garcia de la R. G. 1996.** Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. – Am. Potato Res. 73: 149-154; **26. 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; **27. Majewska-Sawka A. 2012.** Struktura i właściwości komórek roślinnych. [W:] Biotechnologia roślin. Red. Malepszy S. PWN Warszawa: 12-21; **28. Malepszy S. 2001.** Biotechnologia roślin. PWN Warszawa: 36; **29. Manzer F. E. 1958.** Potato meristem culture and virus X. Retrospective Theses and Dissertations. Paper 229; **30. Meyboudi D. E., Mozafari J., Babaeiyan N., Rahimian H. 2011.** Application of Electrotherapy for the Elimination of Potato Potyviruses. – J. Agric. Sci. Tech. 13: 921-927; **31. Nascimento L. C., Pio-Robeiro G., Willadino L., Andrade G.E. 2003.** Stock indexing and potato virus y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. – Scientia Agricola 60(3): 525-530; **32. 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; **33. Norris D. 1954.** Development of virus-free stock of Green Mountain Potato by treatment with malachite green. – Aust. J. Agric. Res. 5: 658-663; **34. Oshima N., Livingstone H. C. 1961.** The effects of antiviral chemicals on potato virus X-1. – Am. Potato Res. 38: 294-299; **35. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. 2013.** Review of viruses in plants: twenty years of Progress. – Span. J. Agric. Res. 11(1): 173-188; **36. Sekrecka D., Michałowska D. 2013.** Zasoby banków genów *in vitro* ziemniaka i ich zastosowanie w praktyce. – Ziemn. Pol.: 15-19; **37. Shambhu P.D., Hak T. L., Buddhi P. S. 2008.** Electrotherapy and Chemotherapy for Eliminating Double-Infected Potato Virus (PLRV and PVY) from In Vitro Plantlets of Potato (*Solanum tuberosum* L.). – Hortic. Environ. Biotech. 49(1): 52-57; **38. Stance-Smith R., Mellor C. F. 1968.** Eradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary bud culture. – Phytopathology 58(2): 199-203; **39. Thomson 1956.** Studies on the effect of malachite green on potato viruses X and Y. – Aust. J. Agric. Res. 7: 428-434; **40. Vasti S. M. 1973.** Effect of antiviral chemicals on production of virus X free potato tubers. – Pak. J. Bot. 5(2): 139-142; **41. Wambugu F. M., Secor G. A., Gudmestad N. C. 1985.** Eradication of potato virus Y and S from potato by chemotherapy of cultured axillary bud tips. – Am. Potato J. 62, 12: 667-672; **42. Wang Q., Liu Y., Xie Y., You M. 2006.** Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato Leafroll Virus (PLRV) i Potato Virus (Y). – Potato Res. 49:119-129; **43. Wang Q., Valkonen J. P. T. 2009.** Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication. – Trends Plant Sci. 14(3): 119-122; **44. Yang L., Nie B., Liu J., Song B. 2014.** A Reexamination of The Effectiveness of Ribavirin on Eradication of Viruses in Potato Plantlets *in vitro* Using ELISA and Quantitative RT-PCR. – Am. J. Potato Res. 91: 304-311; **45. Zaklukiewicz K. 1971.** Uzyskanie bezwirusowych roślin ziemniaka drogą hodowli kultur tkankowych. – Biul. Inst. Ziemn. 7: 69-79; **46. Zaklukiewicz K. 1982.** Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. – Ziemniak 1981/82: 137-160; **47. Zaklukiewicz K. 1983.** The effects of thermotherapy, meristem size and medium on the obtainment of potato plants and their healthiness. – Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 291: 379-383; **48. Zapata C., Miller C. Jr., Smith R. H. 1995.** An *in-vitro* procedure to eradicate potato viruses X, Y, i S z Russet Narkotah and two of its strains. – In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 31:153-159