

**DOROTA MICHAŁOWSKA**  
**AGNIESZKA PRZEWODOWSKA**  
**WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI**  
**PAULINA BURYŁO**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie  
Kierownik Tematu: mgr inż. Dorota Michałowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy  
Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, 76-009 Bonin, 94 3423031 wew. 213,  
e-mail: [michalowska@ziemniak-bonin.pl](mailto:michalowska@ziemniak-bonin.pl)

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 63.*

## Eliminacja patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro*

### **Elimination of non-quarantine pathogens (viruses and endophytic bacteria) and control of potato plantlets healthiness in the *in vitro* bank**

**Słowa kluczowe:** bakterie endogenne, biocydy, chemioterapia, *in vitro*, termoterapia, ziemniak

Głównym celem zadania nr 63 są prace nad doskonaleniem metod uwalniania roślin ziemniaka od patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro*.

Choroby wirusowe ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty w plonie bulw. Największe zagrożenie stanowi wirus PVY ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska, 2000). Z kolei wirus PVS i PVM ziemniaka, które łatwo się rozprzestrzeniają mogą powodować straty rzędu 30% (Kostiw, 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a także są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli, 2001).

W ramach tematu badawczego wykonano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów PVS i PVM ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej

z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Już w 1952 roku ukazały się pierwsze informacje w literaturze o tym, iż wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin, 1952). Kolejne badania wykazały że ilość roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam i Tedesse, 2008), jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz, 1982; Ali i in., 2013). W tegorocznych badaniach wykazaliśmy również jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin *in vitro* ma czynnik osobowy, na co składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu. Z materiału poddanego tym samym warunkom termoterapii, w zależności od wykonawcy uzyskano z merystemów od 68% (wykonawca 1) do 30% (wykonawca 2) roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa 26,4% (wykonawca 1) do 8% (wykonawca 2).

Antymetabolity stosowane w chemioterapii 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). Nasir i in. (2010) oraz Mahmoud i in. (2009) zaobserwowali, że rybawiryne z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, natomiast tiouracyl sporadycznie eliminował PVS oraz wirusa PVX. Stosowanie antymetabolitów ma również wady, gdyż wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywce następuje proporcjonalny wzrost liczby roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii, ale zmniejsza się liczba roślin zdolnych do regeneracji (Nasir i in., 2010; Mahmoud i in., 2009). Nasze badania wykazały, że wyższe dawki RBV obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, ale działają fitotoksycznie na eksplantaty. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM ziemniaka. Natomiast zastosowane dawki tiouracylu nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVS i PVM ziemniaka, jedynie zmniejszyła się koncentracja wirusa PVY ziemniaka. Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Bakterie endofityczne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikro-rozmnażania nie daje stuprocentowej pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno jest powiedzieć o kulturach *in vitro* że są sterylne. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in., 2012). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. Proces ten ujawnia się w kulturach po 3–5 dniach od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych.

Celem tematu w 2018 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych: PPM<sup>TM</sup>, ProClin 300® i AgNO<sub>3</sub>, pod kątem skuteczności zwalczania

zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności.

Biocyd PPM™ został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, tytoń (Compton, Koch, 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ preparatu w ograniczeniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę, że musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku roślin, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych i bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań zaobserwowano, że 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% „czystych kultur”. Wyższe dawki — od 0,4% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych. Również dodatek do pożywki ProClin300® eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 100% przy zastosowaniu najwyższej dawki i w 86,67% przy zastosowaniu niższej dawki. 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 (AgNO<sub>3</sub>) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian. Dodatkowo przeszczepione fragmenty roślin *in vitro* zareagowały na azotan srebra, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobulwkami.

W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM™ i ProClin 300® na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka. Niestety preparaty te nie powodują trwałego „oczyszczenia”, tzn. po przeszczepieniu roślin *in vitro* z podłoża z dodatkiem biocydu na standardowe podłoże MS tylko wierzchołkowe fragmenty roślin zachowały czystość bakteryjną. Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki PPM™ i ProClin 300® wyeliminują bakterie endogenne z kultur *in vitro* ziemniaka.

#### LITERATURA

- Biniam T., Tedesse M. 2008. A survey of Vidal status on potatoes grown in Eritrea and *in vitro* elimination of local variety Tsaeda embaba. *Afri. J. Biotech.* 7 (4): 397 — 403.
- Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. *Wiś Jutra* 3 (20): 27 — 29.
- Compton M., Koch J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 259 — 261.
- 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.
- Kostiw M. 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. *Wiś Jutra* 1 (174): 28 — 29.
- Mahmoud S. Y. M., Hossen 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.

- Malepszy S. 2001. *Biotechnologia roślin*. PWN, Warszawa 2001: 36.
- Morel G., Martin C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.* 235: 1324 — 1325.
- 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.* 22 b (1): 63— 70.
- Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* Vol. 87. No: 3: 223 — 230.
- Zaklukiewicz K. 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. *Ziemniak* 1981/82: 137 — 160.