

KATARZYNA ZAKLUKIEWICZ

Instytut Ziemiaka w Boninie

UWALNIANIE ROŚLIN OD WIRUSÓW

W celu uzyskania materiału wolnego od wirusów z różnych gatunków roślin uprawnych porażonych jednym lub kilkoma wirusami, należy zastosować takie metody, które umożliwiłyby uzyskanie roślin wolnych od wirusów.

Dzięki zastosowaniu termoterapii, wprowadzeniu substancji inhibujących namnażanie wirusów, chemoterapii, prowadzeniu *in vitro* kultur stożków wzrostu (merystemów) lub kombinacji tych metod, można uzyskać rośliny wolne od wirusów.

Należy jednak pamiętać, że określenie: „wolne od wirusów” nie oznacza wcale, że materiał ten nie podlega ponownej infekcji, na co zwracają uwagę Quak [89] oraz Svobodova [105].

W artykule tym, na przykładzie różnych gatunków roślin, omówiono metody uzyskiwania roślin wolnych od wirusów.

Termoterapia

Istnieje wiele publikacji na temat uwalniania materiału roślinnego od wirusów przez działanie wyższymi temperaturami. W zależności od materiału z jakim mamy do czynienia, możemy zastosować ciepłe kąpiele wodne lub ogrzewanie ciepłym powietrzem. Kąpielom wodnym można poddawać materiał roślinny w stanie uśpienia jak: bulwy, cebulki, nasiona lub też części zdrewniałe roślin. Niektóre wirusy mogą być w ten sposób całkowicie wyeliminowane bez uszkodzenia materiału roślinnego poddawanego kąpielom. Kąpiel trwa od kilku minut do 2 godzin przy temperaturze wody około 50°C [44]. Krótki okres czasu jaki jest często potrzebny do inaktywacji niektórych wirusów sugeruje, że ich punkt inaktywacji termicznej w roślinie może być niższy. Wyższe temperatury prawdopodobnie indukują w komórkach powstawanie substancji lub też warunków w których następuje przyspieszenie inaktywacji wirusa [44].

Działanie ciepłym powietrzem stosuje się na kiełkujące bulwy, cebulki, części zielone roślin, a także podobnie jak kąpiele wodne, na pędy zdrewniałe drzew i krzewów oraz na nasiona.

Przy działaniu wysokimi temperaturami na rośliny trzeba zwracać uwagę, by nie spowodować śmierci rośliny przez: denaturację protein, uwolnienie lipidów, destrukcję hormonów, uduszenie tkanek, wyczerpanie zapasów żywności czy też zachwianie metabolizmu bez akumulacji lub z akumulacją toksycznych półproduktów [3].

Do tej pory nie wiemy w jakim stopniu wyższe temperatury eliminują z roślin wirusy. Kassanis [43] wykazał, że zdolność wirusów do infekcji i namnażania w roślinach przy 36°C nie jest skorelowana z ich termicznym punktem inaktywacji — tj. temperaturą przy jakiej są inaktywowane w ciągu 10 minut *in vitro*. Na przykład termicznym punktem inaktywacji wirusa krzaczastej karłowatości pomidora jest 80°C, jednakże już przy 36°C nie może on infekować i jest całkowicie eliminowany z roślin utrzymywanych w tej temperaturze. Natomiast jeden ze szczepów wirusa mozaiki tytoniu (TMV) jest stabilny przy 65°C, a inaktywacji ulega dopiero przy około 70°C [57]. Koncentracja tego wirusa była wyższa, gdy rośliny rosły przy 36°C niż przy 20°C [44]. Tak więc eliminacja wirusów z roślin poddanych działaniu około 37°C musi być przypisywana raczej właściwościom metabolitów, które przesuwają równowagę między syntezą i rozkładem wirusa czy też utrudniają namnażanie wirusa w takiej temperaturze [34].

Istniał pogląd, że stopień trudności eliminowania wirusów z roślin poddanych terapii cieplnej związany jest z kształtem ich cząsteczek [38, 43]. Do roku 1964 wszystkie wyeliminowane z roślin przy pomocy terapii cieplnej wirusy, należały do grupy wirusów mających kształt kulisty [43]. Nyland i Goheen [72] stwierdzili jednak, że łatwość inaktywacji nie zależy od kształtu cząsteczek wirusa, gdyż zarówno do grupy łatwo jak i trudno inaktywujących się należą wirusy o budowie pałeczkowatej i kulistej.

W wielu przypadkach udało się uwolnić całą roślinę od wirusów. Truskawki uwolniono od wirusów: mozaiki truskawki [7], liściozwoju truskawki oraz kędzierzawki truskawki [18], jabłonie od wirusa mozaiki jabłoni, maliny od wielu wirusów [90], tytonie (*N. clevelandii*) od wirusa pierścieniowej plamistości goździka [36]. Udane też były próby uwolnienia bulw ziemniaka od wirusa liściozwoju [26, 41] i wirusa czarnej miotły [54]. Holmes [37] przeprowadził udane próby z uwolnieniem sadzonek róż od wirusa mozaiki róży. Częściej jednak tylko najmłodsze partie rośliny poddanej terapii cieplnej uwalniano od wirusów, jak to było w przypadku wielu wirusów jabłoni, czarnej porzeczki [9, 10, 11], a także pestkowych drzew owocowych [123]. Mellor i Stace-Smith [63] próbowali uwolnić rośliny ziemniaka od wirusa X, przy pomocy terapii cieplnej. Pierwsze wolne od wirusa X sadzonkibrane były po 15 tygodniach działania na rośliny powietrzem o temperaturze 33—37°C. W miarę wy-

dłużania czasu stosowania terapii cieplnej zwiększała się liczba pozyskiwanych wolnych od wirusów sadzonek.

Nie tylko wyższe temperatury mogą ograniczać, czy też wręcz unie możliwiać namnażanie wirusa w tkankach roślinnych. Prace prowadzone nad TMV i innymi wirusami wykazały, że na namnażanie wirusa mogą wpływać temperatury ekstremalne. Bald [4] wykazał, że namnażanie TMV wzrasta w roślinach tytoniu wraz ze wzrostem temperatury do 36°C. W niskich temperaturach malała zarówno translokacja jak i nasilenie systemicznej infekcji. Wirus ten bardzo silnie się namnażał przy zastosowaniu temperatur zmiennych (30° i 13°C) w 12 godzinnym cyklu dzień-noc i znacznie szybciej niż przy temperaturze stałej 25°C w warunkach szklarniowych oraz szybciej niż w temperaturach wahających się od 20°—23°C. Gdy zwiększono różnice temperatur między dniem a nocą od 40° do 10°C, infekcyjność wirusa była niższa, zaś przy temperaturach od 44° do 6°C koncentracja wirusa ograniczała się tylko do lokalnych plam.

Chemoterapia

Jest wiele prac wykazujących ujemny wpływ niektórych substancji chemicznych na wirusy. Jak podają Luria i Darnell [57], różne inhibitory mogą wpływać na biosyntezę wirusów roślinnych.

2-tiouracyl i azaguanina hamują namnażanie wirusa [6] i mogą być włączone do wirusowego RNA. U TMV tiouracyl może zastąpić 5—20% uracylu, a taki wirus ma mniejszą zakaźność niż normalny. Tiouracyl często znosi całkowicie objawy infekcji, gdy jednak wpływ jego ustaje namnażanie wirusa może być podjęte na nowo. 8-azaguanina może być włączona do RNA u TMV w ilości 3—5% guaniny a namnażanie jego jest wówczas opóźnione i zmniejszone. Sposób działania tych analogów kwasu nukleinowego nie jest jednak w pełni zrozumiały. Niektóre mogą wpływać na szybkość replikacji RNA, inne mogą powodować błędy transkrypcji w syntezie białka [57]. Pennazio [78] badał wpływ 8-azaguaniny, 5-fluorouracylu, 2-tiouracylu i fluorofenylaminy na inhibowanie PVX w wyciętych merystemach wierzchołkowych ziemniaka prowadzonych *in vitro*. Stwierdził, że tylko 2-tiouracyl zredukował do zera koncentrację PVX w 7 na 48 przypadków. O redukującym wpływie tiouracylu na koncentrację wirusa są wzmianki nie tylko w przypadku wirusa X ziemniaka [60, 74, 75, 88] ale również TMV [52], kompleksu wirusów TMV + PVX [33] czy też X + S [88]. Thiouracyl może również wpływać dodatnio na infekcyjność wirusów [52], a także na koncentrację [53]. Przeprowadzono próby pozyskania bezwirusowych roślin po zastosowaniu zieleni mala-

chitowej, które wypadły różnie, pozytywnie [71, 74] lub też negatywnie [112]. W badaniach stosowano również aktidion i dextremycynę [30], które wpływały na obniżenie koncentracji kompleksu wirusów TMV + PVX. Verma i Raychandhuri [116] uzyskali stymulację namnażania PVX w tkance kallusowej otrzymanej z łodygi roślin tytoniu po zastosowaniu kwasów: taninowego i elaginowego.

Badano również wpływ aktynomycyny D [AMD] na namnażanie wirusów. Stwierdzono hamujący wpływ AMD na namnażanie wirusa mozaiki kalafiora [111]. Wpływ AMD na PVX był jednak odmienny [92]. Synteza wirusa X w obecności AMD była znacznie podwyższona. Kozłowska [48] podaje, że aktynomycyna D ma właściwość blokowania DNA znajdującego się w chromosomach jądra komórkowego, nie wpływa jednak na syntezę wirusowego RNA, która jest niezależna od zablokowanego DNA.

Martinowa i Reifman [61] stwierdzili, że na namnażanie PVX może wpływać rybonukleaza. Wpływ jej zależał od momentu i czasu działania rybonukleazy za zakażoną roślinę. Kozłowska [48] podaje, że RNA wirusowe jest niewrażliwe na działanie enzymu rybonukleazy. Zwraca jednak uwagę, że syntezę związków białkowych potrzebnych do odtworzenia kompletnej cząstki wirusowej, można zahamować działając chloramphenicolem lub wysoką temperaturą. W obu tych przypadkach nie powstaje podwójny łańcuch RNA na skutek zablokowania enzymu odpowiedzialnego za tę syntezę.

Kozłowska [47, 49] badała również wpływ EDTA (kwas wersenowy) na syntezę i namnażanie wirusa. Stwierdziła, że dodatek EDTA do pożywki, w której umieszczono roślinę porażoną wirusami, stymulował syntezę wirusową. Znacznie wzrastała zawartość wirusowego RNA w strefie bliskiej wierzchołka korzenia zawirusowanych roślin. Wpływ EDTA na rozmieszczenie i koncentrację TMV w szczytowych częściach korzeni pomidorów naświetla w swej pracy Wajda [118]. EDTA powoduje histologiczne zmiany w stożkach wzrostu — a mianowicie — znaczne skrócenie strefy podziału i parenchymatyzację tkanek merystematycznych oraz wierzchołkowych stref korzeni. Oba te zjawiska: zmniejszenie aktywności mitotycznej jak i parenchymatyzacja tkanek merystematycznych, sprzyjają inwazji wirusa w kierunku części wierzchołkowych korzeni.

Singh [94] badał wpływ kilku regulatorów wzrostu roślin na nasilenie infekcji wirusowej. Stwierdził on, że roztwory kwasu indoliloctowego (IAA), indolilomasłowego (IBA) oraz P-chlorofenoksyoctowego (PCPxAA), wyraźnie redukowały koncentrację wirusa zmniejszenia liści melonowca w liściach roślin melonowca.

Svobodova [107] i Walkey [120] na podstawie wyników uzyskanych w swych badaniach sugerują, że kinetyna dodana do pożywki, na której

prowadzone są stożki wzrostu pobrane z roślin porażonych wirusami może mieć wpływ na zahamowanie namnażania w nich wirusa.

W literaturze jest więcej wzmianek o przypuszczalnym wpływie pożywki na uzyskanie roślin wolnych od wirusów [51, 81, 102, 121]. Penazio i Redolfi [81] na podstawie wyników doświadczeń stwierdzili, że pożywka w istotny sposób może wpłynąć na uzyskanie roślin wolnych od wirusów dzięki prowadzeniu *in vitro* merystemów pobranych z roślin porażonych wirusami.

Tsou i Rich [115] stwierdzili, że immunna na wirus X odmiana ziemniaka Saco zawiera jakieś substancje inhibujące wirus X. Wobec tego wszczepiono [93] w bulwy Saco oczka bulw zawierających wirus X. Uzyskano w ten sposób znaczne obniżenie koncentracji wirusa X. Rośliny wolne od tego wirusa uzyskano jednak dopiero po dodatkowym zastosowaniu terapii cieplnej (38°C).

Jak wynika z przytoczonych prac wiele substancji można stosować w celu eliminowania wirusów z rośliny, należałoby tylko ustalić czas ich działania oraz stężenie. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w połączeniu z prowadzeniem *in vitro* stożków wzrostu roślin.

Kultury merystemów

Limasset i Cornuet [55] wysunęli przypuszczenie, że komórki merystematyczne stożków wzrostu dalii porażonych wirusem mozaiki są wolne od tego patogena gdyż wykazali, że koncentracja wirusa maleje w roślinie w miarę zbliżania się ku jej wierzchołkowi. Houten i in. [38], Svobodova [105], Christensen [13] są zdania, że różne wirusy mogą znajdować się w różnej odległości od stożka wzrostu, z czym związany jest stopień trudności uwolnienia od wirusów.

Svobodova [101] prowadząc prace nad uwalnianiem roślin ziemniaka od wirusa Y zastosowała metodę prowadzenia *in vitro* wierzchołków wzrostu o dosyć dużych wymiarach, w połączeniu z kilkakrotnym ich pasażowaniem. Stwierdziła, że podczas kolejnych pasażów koncentracja wirusa malała, co sugerowałoby, że uzyskanie z merystemów roślin wolnych od wirusa nie musi być dowodem na to, że merystem nie zawiera cząsteczek wirusa.

Dzięki prowadzeniu *in vitro* merystemów wierzchołkowych otrzymano rośliny wolne od wirusów z szeregu różnych roślin: irysa [5], caladium [27, 37], kolakasji [28], rabarbaru [119], truskawek [117], goździków [76], ziemniaków [22, 65, 68, 104, 114].

Podobnie do termoterapii, metoda ta napotyka na wiele trudności [65, 66]. Aby osiągnąć jak najlepsze wyniki pracy, należy wycinać jak

najmniejszy wycinek — eksplantat. Wycięty wierzchołek wzrostu powinien zawierać tylko część szczytową i podszczytową bez dalszych jego części w których następuje formowanie pędu i dalsze różnicowanie tkanek. Wymiary takiego eksplantatu mieszczą się w granicach 100μ długości (wysokości) i około 250μ szerokości. Wycięcie tak małego eksplantatu bez uszkodzenia go nie jest łatwe. Ze względu na mikroskopijne wymiary eksplantatu utrudniony jest również jego rozwój. Im jednak mniejszy wycinek jest pobrany, tym większe prawdopodobieństwo uzyskania roślin wolnych od wirusa. Ponieważ zdolność różnicowania organów: pędów i korzeni jest niejednakowa w kulturach tkankowych różnych gatunków roślin [109, 110], wielkość pobranego wycinka należy uzależniać od: gatunku rośliny oraz od wirusa z jakim mamy do czynienia.

Dunin i in. [17] zastosowali metodę szczepienia stożków wzrostu ziemniaka na pomidorach, na których szybko się rozwijały. Roślina pomidora była w tym przypadku jednocześnie rośliną testową na obecność wirusów.

Rośliny wolne od wirusa można też uzyskać z innych części rośliny np.: korzeni [2] czy też kallusu uzyskanego z łodyg [103, 106].

Można zadać sobie pytanie czy merystem jest rzeczywiście wolny od wirusów? Wiele późniejszych prac temu przeczy. Walkey i Webb [120] stwierdzili obecność cząstek różnych wirusów w merystemach roślin tytoniu inokulowanych 3 i 6 tygodni wcześniej. Obserwowano również obecność cząstek wirusa X w merystemach pochodzących z roślin ziemniaka [1, 51]. A więc merystemy mogą ale nie muszą być wolne od wirusów. Obecność wirusów w merystemach zależy prawdopodobnie między innymi od temperatury w jakiej rośliny się rozwijają, wieku rośliny, wirusa z jakim mamy do czynienia (wyniki badań własnych).

Czynniki wpływające na rozwój merystemów prowadzonych w kulturach in vitro

Skład pożywki. Na temat pożywek — ich składu można znaleźć bardzo wiele prac. Heller [29] wykazał doświadczalnie znaczenie poszczególnych składników oraz ich proporcji w roztworze dla rozwoju rośliny. Skład jego pożywki jest jednak bardzo ubogi, wystarczający dla rozwiniętych roślin, ale niewystarczający dla merystemów, które mają wyższe wymagania ze względu na ich specyfikę. Merystemy wierzchołkowe ziemniaka dla normalnego wzrostu potrzebują wysokiej koncentracji jonów K^+ i NH_4^+ , gdyż w ich obecności następuje synteza auksyn [66]. Nie bez znaczenia jest również powiązanie jonów, np.: wiązanie jonu amonowego z azotanowym jest korzystniejsze niż z jonem chloru

[67], zaś żelazo w kompleksie Na Fe EDTA jest lepiej przyswajalne niż z chlorku [69]. Gwóźdź i Szweykowska [24] zwrócili uwagę na wpływ poziomu azotanów na różnicowanie kultur korzeni *Cichorium intybus*. Wykazali oni, że morfogenetyczna forma regeneracji w korzeniach *Cichorium* może być determinowana przez odżywcze składniki pożywki.

Na temat dodawania hormonów roślinnych do pożywek, na których są prowadzone merystemy, jest wiele prac [8, 15, 20, 21, 23, 39, 56, 69, 73, 79, 82, 84, 95, 100, 122]. Ogólnie wiadomo, że dla normalnego rozwoju merystemu, oprócz składników mineralnych, potrzebny jest dodatek: gibbereliny w celu stymulacji wzrostu oraz różnicowania organów, kinetyny — niezbędnej dla prawidłowego metabolizmu i regulowania podziałów komórkowych [59, 60] oraz NAA lub IAA — w obecności których procesy różnicujące tkanki przebiegają sprawniej i szybciej [96]. Bardzo ważnym jest utrzymanie odpowiedniego stosunku ilościowego między poszczególnymi składnikami.

Gregorini podaje [22], że dla rozwoju merystemów ziemniaka niezbędna jest GA w ilości 0,1 mg/l, natomiast NAA i kinetyna nie są niezbędne. Jeśli jednak dodajemy NAA w ilości 0,5 mg/l lub 0,25 mg/l, należy równolegle dodać 0,5 mg/l kinetyny na litr pożywki.

Dodatek niektórych witamin uważany jest często za niezbędny [20, 56, 73]. Najczęściej wymieniane są: tiamina, pirodyksyna i niacyna. Witamina C w wyższych stężeniach niż 1% uważana jest za toksyczną [20]. Dodatek ekstraktu z drożdży zapobiega śmiertelności [21, 66].

K w a s o w o ś ć. Czynnikiem ograniczającym wzrost merystemów na pożywce może być jej pH. Ogólnie przyjmuje się, że powinno się ono wahać w granicach 5,5—5,8. Podczas autoklawowania pH może znacznie spaść (około 0,5). Mellor i Stace-Smith [62] obserwowali, że pH wcześniej przygotowanej pożywki spada w ciągu tygodnia o około 0,3 (z 5,7 do 5,4). Przy zbyt niskim pH może być wstrzymane ukorzenianie się eksplantatów. Inaczej ustosunkowują się do zagadnienia Pennazio i Redolfi [86], gdyż wykazali, że przy pH pożywki równym 5,6, rozwijają się często zdeformowane twory, podczas gdy przy pH utrzymującym się w granicach 4,9—5,2, następuje normalny rozwój roślin.

K o n s y s t e n c j a. Jako formy nośnej dla umieszczonego na pożywce merystemu, stosuje się agar w ilościach 0,2 do 0,8%. Pożywka z dodatkiem agaru ma konsystencję galaretki. W przypadku użycia pożywki płynnej, nośnikiem jest pasek bibuły filtracyjnej, wygiętej w kształcie litery M, umieszczonej w próbówce z pożywką. W literaturze spotyka się pogląd, że pożywka płynna jest lepsza od zestalonej agarem ze względu na większą aerację pożywki [12]. Są też zdania, że pożywka zestalona agarem nie jest gorsza od płynnej a na jej korzyść przemawia to, że jest mniej kłopotliwa w użyciu od pożywki płynnej [39, 45]. Uzys-

kiwane w poszczególnych laboratoriach wyniki są bardzo różne, trudno więc jednoznacznie powiedzieć jaka pożywka jest lepsza. Porównując jednak pożywki: płynną i stałą, Mellor i Stace-Smith [62] wykazali, że niektóre substancje wzrostowe są bardziej szkodliwe dla wyciętego merystemu gdy jest on umieszczony na pożywce płynnej niż gdy znajduje się na zestalonej agarom. Być może dla pożywki płynnej substancje wzrostowe powinny być stosowane w niższych koncentracjach niż poleca się dla zestalonej agarom.

Wielkość eksplantatu. Dalszy rozwój rośliny w dużym stopniu zależy od wielkości eksplantatu. Im merystem jest mniejszy, tym trudniej dobrać odpowiednią pożywkę. Ukorzenianie również w dużym stopniu zależy od wielkości eksplantatu. Stone [99] podaje, że stożki wzrostu goździków mniejsze niż 0,2 mm nie mogą się ukorzeniać, zaś większe niż 0,75 mm dają zawirusowane rośliny. Ogólnie uważa się, że wielkość merystemu 0,2—0,5 mm jest wielkością optymalną. Dla rabarbaru konieczne jednak okazało się wycinanie stożka wzrostu zawierającego 2—3 pierwotne listki, gdyż mniejsze eksplantaty nie rozwijały się [119].

Materiał do izolacji merystemów wierzchołkowych. W bardzo wielu gatunkach roślin do izolacji używa się pączków szczytowych lub bocznych — kątowych. Hollings i Stone [34] podają, że izolując stożki wzrostu chryzantem, większy procent roślin uzyskali z pączków szczytowych (32%) niż z bocznych (18%). W pracach dotyczących prowadzenia merystemów ziemniaka mówi się o pączkach szczytowych jak i bocznych zarówno z kielków bulw jak i z pędów roślin ziemniaka. Dyskusyjny jest jednak problem czy kielki bulw ziemniaka z których pobiera się stożki wzrostu, mają być etiolowane, czy też prowadzone na świetle. Huth i Bode [39] w swej pracy wyrazili pogląd, że kielki etiolowane są nieprzydatne.

Ważnym jest również wiek rośliny z której pobiera się pączki do izolowania merystemów. Lepsze do tego celu są rośliny młode [8].

Sezon. Stone [100] zauważył, że stożki wzrostu goździków lepiej się rozwijały oraz rozwijała się z nich większa ilość roślin, podczas wiosny i jesieni niż zimą i latem. Podobne zależności występują u roślin ziemniaka [62, 90].

Odmiany. Jest szereg doniesień o różnicach międzyodmianowych w łatwości uzyskania roślin z merystemów prowadzonych *in vitro*. Merystemy odmian wczesnych ziemniaka łatwiej się rozwijały niż odmian późnych [58]. Procent uzyskiwanych roślin z merystemów ziemniaka wahał się od 2 do 34 [126]. Podobne zależności występują też u innych gatunków roślin [25].

Warunki zewnętrzne. Kultury *in vitro* utrzymywane są na

ogół w temperaturach oscylujących wokół 22°C i wilgotności powietrza około 90% wilgotności względnej.

Najodpowiedniejszym oświetleniem jest oświetlenie 14—16-godzinne z zachowaniem cyklu dobowego: dzień-noc [8, 84]. Warunki światła wpływają nie tylko na morfogenezę i naturę wzrostu, ale również na aktywność fizjologicznie czynnych substancji dodanych do pożywki [8].

Na temat wymaganego natężenia światła zdania są podzielone. Diba i in. [16] uważają, że 12 000 luksów jest najkorzystniejszym oświetleniem, zaś Pennazio [80] uważa, że 4 000 luksów ze spektrum podobnym do dziennego, lecz nieco bogatszym w czerwień stwarza optymalne warunki do rozwoju. Polewaja również [85, 86] zwraca uwagę na dobór odpowiedniego spektrum światła w połączeniu z jego natężeniem.

Dezynfekcja materiału roślinnego. Materiał roślinny pobierany do wycinania stożków wzrostu odkażany jest najczęściej w 5% roztworze podchlorynu wapnia (Ca/OCl_2), a następnie płukany kilkakrotnie w sterylnej destylowanej wodzie. Stone [100] wykazał, że znacznie mniej infekcji przy prowadzeniu kultur goździków miał wówczas, gdy izolację przeprowadzał bez uprzedniego odkażenia materiału roślinnego. Gorbarenko i Żuk [21] zauważyli, że sterylność kultur zależy od miejsca pobrania pączka. Dla pączków bocznych sterylność wahała się w granicach 68%, zaś pączków wierzchołkowych w granicach 42%.

Pojemniki do prowadzenia kultur. Merystemy najlepiej rosną w probówkach lub erlenmayerkach ze szkła pyreksowego, które najmniej oddziałują na składniki pożywki. Huth i Bode [39] używali z dużym powodzeniem szalek Petriego. Probówki jak i erlenmayerki można zamykać korkiem z waty i parafilmem, kapsłem aluminiowym a także korkiem z syntetycznej gumy z umieszczoną w środku szklaną rurką w celu umożliwienia wymiany powietrza.

Przed użyciem, zarówno szkło jak i wata, kapsle czy też korki, powinny być wysterylizowane.

Przy odpowiednim dobraniu wszystkich tych czynników, o jakich była mowa wyżej, merystemy mogą się rozwijać w rośliny, o ile nie była przy wypreparowaniu uszkodzona kopuła merystemu. Jeżeli kopuła została uszkodzona, rozwijają się wówczas jeden lub dwa liście z dosyć dużą masą korzeni.

Okres rozwoju, wyizolowanego stożka wzrostu, na pożywce aż do uzyskania rośliny jest bardzo różny. Niektóre gatunki roślin rozwijają się już w kilkanaście dni po wycięciu, inne zaś potrzebują nieco więcej czasu. W naszych warunkach [125], najkrótszy okres rozwoju merystemu ziemniaka wynosił 4 tygodnie. Najwięcej merystemów rozwinęło się jednak w rośliny między 4—6 miesiącem od chwili umieszczenia ich na pożywce.

Łączenie metod w celu uzyskania materiału wolnego od wirusa

Ponieważ żadna z wymienionych metod do tej pory nie daje, z wcześniejszych omówionych względów, zbyt dużej pewności uzyskania materiału wolnego od wirusów, zaczęto łączyć te metody oczekując lepszego efektu. I tak w istocie było. W latach pięćdziesiątych zaczęły się ukazywać prace o pozytywnych wynikach połączenia chemoterapii z prowadzeniem *in vitro* merystemów na pożywkach [71, 75, 88]. Zasady łączenia tych dwóch metod były jednak różne. Substancje mające za zadanie zachwiać procesami syntezy cząstek wirusa stosowano na rośliny mateczne [88], a następnie izolowano stożki wzrostu, lub też substancje te dodawano do pożywki w celu inaktywacji wirusa, lecz dopiero w wyciętych merystemach [67, 71, 88, 112]. Ponieważ jednak, substancje te działają często fitotoksycznie, lub nie mają wpływu na jakiegokolwiek procesy związane z namnażaniem wirusa gdy działanie ich ustaje, wydaje się, że większą przyszłość ma łączenie termoterapii z prowadzeniem *in vitro* kultur stożków wzrostu.

Uzyskiwanie roślin bezwirusowych dzięki hodowli *in vitro* eksplantatów pobranych z roślin uprzednio poddanych termoterapii, jest w literaturze bardzo szeroko omawiane. Morel i in. [67] uważają, że część rośliny, która rozwinie się podczas działania na tę roślinę wyższymi temperaturami, powinna być wolna od wirusów. Odizolowanie tej części od rośliny matecznej powinno pozwolić na uzyskanie roślin wolnych od wirusów.

Metoda ta znalazła bardzo szerokie zastosowanie przy uwalnianiu od wirusów szeregu różnych gatunków roślin a także grzybów [70].

Trudno jednoznacznie określić jakie temperatury powinny być stosowane, gdyż zależy to od gatunku rośliny, odmiany, szczepu wirusa z jakim mamy do czynienia [64], a także od czasu ekspozycji [91, 102]. Im wyższe temperatury stosujemy tym krótszy może być ich czas działania. Dzięki zastosowaniu termoterapii możemy pobierać większe wyniki.

W celu uwolnienia roślin truskawek od — latentnego wirusa C i od wirusa otąśmienia nerwów truskawki stosowane były odpowiednio temperatury 46°C i 48°C [7]. Wirusy porażające drzewa jabłoni inaktywowane były przy 37°C. Łącząc przegrzewanie ze szczepieniem zrazów na zdrowych podkładkach uzyskano sadzonki wolne od wirusów [9, 11]. W celu uwolnienia czarnej porzeczki od atawizmu wirusowego czarnej porzeczki, porażone wirusami krzaki porzeczki utrzymywano co najmniej przez 20 dni w temperaturze 34°C a następnie szczepiono ich wierzchołki na zdrowych podkładkach [10]. W celu uzyskania roślin goździków wol-

nych od wirusów stosowano różne temperatury i czas ich działania [19, 32, 33, 87].

Przy uwalnianiu roślin chryzantem od wirusa karłowatości złocienia stosowany był różny czas działania temperaturą 35°C lub 37°C [25, 35, 91]. Rośliny agrestu porażone wirusami poddawano działaniu temperatury 35°C w ciągu dwóch tygodni [40] a następnie wyszczepiano wierzchołki na pożywkę. Svobodova [102] uzyskała 100% roślin fasoli wolnych od wirusa zwykłej mozaiki fasoli poddając embriona fasoli działaniu 100°C w ciągu jednej godziny.

W pracach dotyczących uwalniania roślin ziemniaka od wirusów podaje się, że są one wrażliwe na działanie temperatur w zakresie 32—40°C z niewielkimi odchyleniami w ciągu dnia i nocy [50, 77, 83, 97, 108, 113]. Wykazano, że istnieje zależność między długością okresu przegrzewania a procentem pozyskanych roślin wolnych od wirusów. Liczba pozyskanych wolnych od wirusów roślin wzrasta wprost proporcjonalnie do długości okresu działania temperatury. Duże różnice występują jednak w zależności od wirusa z jakim mamy do czynienia. Stace-Smith i Mellor [97] podają, że wydłużenie okresu działania wyższą temperaturą (33—37°C) na rośliny do 18 tygodni, pozwoliło na uzyskanie 100% roślin wolnych od wirusa X ziemniaka, lecz rośliny te były nadal porażone wirusem S. Podobne dane uzyskał Wright [124]. Są też jednak i przeciwstawne wzmianki w literaturze mówiące, że przy porażeniu roślin ziemniaka kompleksem wirusów np. X + S, M + Y czy też X + Y, często udaje się pozyskać rośliny wolne od wirusów S, M, Y ale w dalszym ciągu porażone są one wirusem X [77, 109]. Być może trudność pozyskania roślin wolnych od wirusa X związana jest z jego namnażaniem się jeszcze przy 36°C, choć w tej temperaturze osiąga on niższą koncentrację niż przy 20°C [44]. Dzięki zastosowaniu tej metody uzyskano również rośliny wolne od PVM [42].

Udało się także uzyskać rośliny ziemniaka wolne od wiroidu wrzecionowatości bulw ziemniaka [98], poddając rośliny termoterapii (33—36°C) i pobierając stożki wzrostu wielkości 0,5—1 mm do prowadzenia *in vitro*. Otrzymano jednak znikomy procent roślin wolnych od tego wiroidu (2,5%). Być może, znaczenie w tym przypadku ma fakt, że PSTV jest wolnym RNA.

W Polsce nad uwolnieniem roślin ziemniaka od wirusów prowadzono prace w kilku ośrodkach. Otrzymano materiał wolny od wirusów z szeregu odmian i rodów hodowlanych stosując metodę termoterapii kiełkujących bulw, a następnie izolowania stożków wzrostu [14, 47, 114] lub też termoterapii całych roślin ziemniaka i izolowania stożków wzrostu [125]. Dzięki zastosowaniu tej metody uwalniania odmian ziemniaka od wirusów S i M uzyskano w latach 1969—1973 ponad 99% roślin bezwi-

rusowych, które wyrosły z merystemów prowadzonych *in vitro* [126].

Kristensen i Thomsen [50] oraz Hollings [31] podali w swych pracach wykaz wirusów od jakich uwolniono różne gatunki roślin, między innymi i ziemniaki.

W celu uzyskania roślin wolnych od wirusów próbowano również wykorzystać działanie pola elektromagnetycznego [18]. Procent uzyskanych zdrowych roślin był bardzo wysoki, wahał się między 90 a 100. Rozwój i wzrost roślin był normalny.

Należałoby tutaj zwrócić uwagę na odpowiednią kontrolę zdrowotności materiału uzyskanego metodą *in vitro*, gdyż wirus może być obecny w tak niskiej koncentracji, że tradycyjnymi metodami (testy serologiczne i biologiczne), nie da się go wykryć. Konieczne są kilkakrotnie przeprowadzone testy w pewnych odstępach czasu, a także kontrola materiału potomnego.

W konkluzji można powiedzieć, że dzięki zastosowaniu odpowiednich metod można uzyskać rośliny bezwirusowe z materiału całkowicie porażonego. Należy tylko pamiętać, że nie są to rośliny immunne, trzeba więc zwracać baczna uwagę na przestrzeganie zasad fitosanitarnych podczas dalszego procesu rozmnażania tych roślin.

LITERATURA

1. Appiano A., Pennazio S.: *J. gen. Virol.* 14, 273—276. 1972.
2. Bajaj Y.P.S., Dionne L.A.: *Am. Potato J.* 43, 384. 1966.
3. Baker K.F.: *Phytopath.*, 52; 1244—1255. 1962.
4. Bald J.G.: *Aust. J. biol. Sci.* 25; 429—431. 1972.
5. Baruch E.R., Quak F.: *Nath. J. Pl. Path.*, 72; 270—273. 1966.
6. Bawden F.C., Kassanis B.: *J. gen. Microbiol.* 10; 160—173. 1954.
7. Bolton A.T.: *Can. J. Plant. Sci.* 47; 375—380. 1967.
8. Butenko R.G.: *Kultury izolowanych tkaniej i fizjologia morfogenezy roślin.* Moskwa, Izdat. Nauka. 1964.
9. Campbell A.J.: *Nature* 195; 520. 1962.
10. Campbell A.J.: *Ann. Rep. agr. hort. Res. Sta. Long Ashton*, 89—92, England. 1965.
11. Campbell A.J., Best M.W.: *Ann. Rep. agr. hort. Res. Sta. Long Ashton*, 65—70, England. 1963.
12. Caplin S.M., Steward F.C.: *Nature*, 163; 920. 1949.
13. Christensen M.: referat wygłosz. na konf. EAPR, Virology Section Meeting, Wageningen, 7—11 VI. 1971.
14. Czapiewska A.: *Biul. Inst. Ziemn.*, 6; 43—49. 1970.
15. Degani N., Steward F.C.: *Ann. of Bot.*, 33; 483—504. 1969.
16. Diba A., Ajrapietjan E., Winkler G., Butienko R.: *Kartofiel i obošči* 3; 44. 1972.
17. Dunin M.C., Guj W.J., Charčenko L.T.: *Zaščita rastenij*, 7; 14—17. 1971.
18. Ghene N., Prodan D.: *A.N. I.C.P.P.*, 9; 73—79. 1973.
19. Goethals M., Van Hoof P.: *Parasitica XXVII*, 36—41. 1971.
20. Goodwin P.B.: *Journal of Exper. Bot.*, 17; 590—595. 1966.
21. Gorbarenko N.J., Žuk J.P.: *Selskochozjajstwennaja biologija*. VI, N. 2, 269—275. 1971.
22. Gregorini G., Lorenzi R.: *Potato Res.*, V. 17, N. 1, 24—33. 1974.
23. Gwóźdź E., Szweykowska A.: *Biul. de la Soc. des Amis des Sci. et des lettres de Poznań*, Ser. D, 8 Liv. 1967.
24. Gwóźdź E., Szweykowska A.: *Biul. de la Soc. des Amis des Sci. et des lettres de Poznań*, Ser. D, 9 Liv. 1969.
25. Hakkaart F.A., Quak F.: *Neth. J. Plant Path.*, 70; 154—157. 1964.
26. Hamid A., Locke S.B.: *Am. Pot. J.* 38, 304—310. 1961.
27. Hartman R.D.: *Phytopath.*, V. 63, N. 4, 442. 1973.
28. Hartman R.D.: *Phytopath.*, V. 64, N. 2, 237—240. 1974.
29. Heller R.: *Ann. Sci. Nat. Onz. Ser. Bot. Biol. Veg.* XIV, 1—223. 1953.
30. Hirai T.: *Ann. Phytopath. Soc. of Japan*, 27; 115—121. 1962.
31. Hollings M.: *Ann. Rev. of Phytopath.* V. 3, 367—396. 1965.
32. Hollings M., Stone O.M.: *Ann. appl. Biol.*, 53, 103—118. 1964.
33. Hollings M., Stone O.M.: *Ann. appl. Biol.*, 56, 73—86. 1965.
34. Hollings M., Stone O.M.: *Scientific Horticulture*, V. 20, 57—72. 1968.
35. Hollings M., Stone O.M.: *Ann. appl. Biol.*, 65, 311—315. 1970.
36. Hollings M., Stone O.M., Bouttell G.C.: *Ann. appl. Biol.*, 65, 299—309. 1970.
37. Holmes F.O.: *Pl. Dis. Reporter*, 44, 46—47. 1960.

38. Houten I.G. ten, Quak F., Van der Meer F.A.: *Neth. J. Pl. Path.*, 74, 17—24. 1968.
39. Huth W., Bode O.: *Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd.*, 22; 37—39. 1970.
40. Jones D.P., Vine S.J.: *J. Hort. Sci.*, 43; 289—292. 1968.
41. Kassanis B.: *Nature*, V. 164; 881. 1949.
42. Kassanis B.: *Ann. appl. Biol.*, 45; 422—427. 1957.
43. Kassanis B.: *J. roy. agr. Soc. England*, 126; 105—114. 1965.
44. Kassanis B., Posnette A.F.: *Recent Adv. Bot. I (IX Int. bot. Congr. Montreal, 1959)*, 557—563. 1961.
45. Kassanis B., Varma A.: *Ann. appl. Biol.*, 59, 447—450. 1967.
46. Kordzińska I., Ryńska G.: *Hodowla i Nas. Ziemn. Dod. Publ. Specjal. N. 8*, 67—72. 1970.
47. Kozłowska A.: *Viruses of plants. Proc. Int. Conf. on Plant Vir. Wageningen, July 1965*, 83—89. 1966.
48. Kozłowska A.: *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. Z. 94*. 1969.
49. Kozłowska A.: *Acta Biol. Cracov., S.B., V. 14*, 111—127. 1971.
50. Kristensen R.H., Thomsen A.: *Tidsskr. Planteavl.*, 74(2), 264—280. 1970.
51. Krylova N.V., Stepanenko V.I., Reifman V.G.: *Acta Virol.*, 17; 172. 1973.
52. Kuhn C.W.: *Virology*, 43(1), 101—109. 1971.
53. Kuhn C.W.: *Phytopath.* 63(10), 1235—1238. 1973.
54. Lechnowicz L.W.: *Kartofel obošci*, N. 7; 48. 1969.
55. Limasset P., Cornuet P.: *Sc. Acad C.R.* 228; 1971—1972. 1949.
56. Linsmaier E.M., Skoog F.: *Physiologia Plantarum*, V. 18; 100—127. 1965.
57. Luria S.E., Darnell J.E.: *Wirusologia ogólna*. PWN. 1970.
58. MacDonald D.M.: *Potato Res.*, 16; 263—269. 1973.
59. Maheshwari P.: *Plant tissue and organ culture, Symp. Dec. 22—29, 1961. The intern. Soc. of plant morfologist. Delhi. 1963.*
60. Manzer F.E.: *Diss. Abstr.*, 19; 423—424. 1958.
61. Martynowa R.W., Reifman V.G.: *Sels kochozjajstwennaja biologija*, T. IV, Z. 3, 474—476. 1969.
62. Mellor F.C., Stace-Smith R.: *Can. J. Bot.* 47; 1617—1621. 1969.
63. Mellor F.C., Stace-Smith R.: *Phytopathology*, V. 57(7); 674—678. 1967.
64. Mellor F.C., Stace-Smith R.: *Phytopath.*, V. 61(2); 246—247. 1971.
65. Morel G.: *Rev. Hort. Sept-October*. 733—740. 1964.
66. Morel G., Muller J.F.: *Physiol. Veg.*; 5250—5252. 1964.
67. Morel G., Martin C., Muller J.F.: *Ann. Physiol. Veg.*, V. 10(2), 113—139. 1968.
68. Mori K., Hamaya E., Shimomura T., Ikegami Y.: *J. centr. Agr. Exp. Sta.*, N. 13; 45—111. 1969.
69. Murashige T., Skoog F.: *Physiol Pl.*, 15; 473—479. 1962.
70. Nair N.G.: *Aust. J. Agric. Res.*, 24; 533—541. 1973.
71. Norris D.O.: *Austr. Journ. of Agric. Res.*, V. 5(4), 658—663. 1954.
72. Nyland G., Goheen A.: *Ann. rev. of Phytopath.*, 331—354. 1969.
73. Okazawa Y., Katsura N., Tagawa T.: *Physiol. Plantarum*, 20; 862—869. 1967.
74. Oshima N., Livingston C.H.: *Am. Pot. J.*, V. 38, 294—299. 1961.
75. Oshima N., Donworth C., Johnson G., Livingston C.H.: *Journal of Colorado-Wyoming Acad. Sci.* V. 5(1); 44. 1960.

76. Oszkinis Wł., Lindner Z., Oszkinisowa K.: *Biuletyn IHAR*, N. 3—4; 115—122. 1968.
77. Pennazio S.: *Riv. Ortoflorfrutticola Italiana* 5; 446—452. 1971.
78. Pennazio S.: *Rivista di patologie veget. S. IV (IX)*, 3—10. 1973.
79. Pennazio S.: *Rivista dell'Ortoflorfrutticola Italiana*, 2; 112—119. 1973.
80. Pennazio S., Redolfi P.: *Potato Res.* 16; 20—29. 1973.
81. Pennazio S., Redolfi P.: *Potato Res.*, V. 17; 333—335. 1974.
82. Pennazio S., Vecchiati M.: *Potato Res.*, 19, 257—261. 1976.
83. Pett B.: *Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz.*, Berlin, B. 10(2), 81—88. 1974.
84. Pillai S.K., Hildebrandt A.C.: *Plant Disease Reported*, V. 52(8); 600—601. 1968.
85. Polewaja W.S.: *Fiziologija rastenij*, T. 14(1); 48—56. 1967.
86. Polewaja W.S.: *Fiziologija rastenij*, T. 14(4); 582—591. 1967.
87. Quak F.: *T. Pl. Ziekten*, 63; 13—14. 1957.
88. Quak F.: *Perg. Press Adv. in Hort. Sci. and Applic.* 1961.
89. Quak F.: *Londbouwkunding Tijdschrift* 78(9); 301—305. 1966.
90. Quak F.: *Proc 18th Int. Hort. Congr. in 1970*, V. III. 12—25. 1972.
91. Quak F., Hakkaart F.A.: *Rev. Roum. Biol. Bot.* 11; 181—184. 1960.
92. Reunowa G.D., Reunow A.V., Reifman V.G.: *Virology* 53(2), 502—506. 1973.
93. Rich E.A.: *Phytopath.*, 59(5), 710—711. 1969.
94. Singh T.B.: *Phytopath. Medit.* 11(3), 197—199. 1972.
95. Skoog F., Miller C.: *Sympos. of the Soc. for Exp. Biology*; 118—131. 1957.
96. Smith C.W.: *Nature*, 207; 780—781. 1965.
97. Stace-Smith R., Mellor F.C.: *Phytopath.* V. 58(2), 199—203. 1968.
98. Stace-Smith R., Mellor F.C.: *Phytopath.* V. 60(12), 1857—1858. 1970.
99. Stone O.M.: *Glas. Crops Res. Inst., Ann. rep.* 1961, wyd. 1962.
100. Stone O.M.: *Ann. appl. Biol.*, 52; 109—209. 1963.
101. Svobodova J.: *Plant. Virol., Proc. 5th Conf. Czechosl. Plant Virologist*, Praga 1962.
102. Svobodova J.: *Proc. Symp. on Host Parasite Relations in Plant Path.*, 47—50, Budapest 1964.
103. Svobodova J.: *Proc. Symp. on Host Parasite Relations in Plant Path.* 65—68, Budapest 1964.
104. Svobodova J.: *Tenth Intern. Congr. Bot. Abstr.*, 485, 1964.
105. Svobodova J.: *O degeneraci barambor. Międzynar. Konf.* 7—14, VI, 1964, Praga i Havlíčkov Brod. 1965.
106. Svobodova J.: *Viruses of plants, Proc. Intern. Conf. Vir.*, Wageningen, July 1965. 1966.
107. Svobodova J.: *Plant Virology, Proc. 6th Conf. Czech. Plant. Virologists*, Olomouc 1967, 128—129. 1967.
108. Sip V.: *Potato Res.* 15, 270—273. 1972.
109. Szweykowska A.: *Wiad. Bot.* V(4), 271—280. 1961.
110. Szweykowska A.: *Postępy Bioch.*, 14(2); 193—200. 1968.
111. Tezuka N., Taniguchi T., Matsui C.: *Virology* 43(3); 717—718. 1971.
112. Thomson A.D.: *Austr. J. of Agricul. Res.* V. 7(5); 428—433. 1956.
113. Thomson A.D.: *Nature* V. 177; 709. 1956.
114. Tomaszewski Z., Kubok I.: *Hod. Rośl. Aklimat. i Nas.* 12(4); 357—365. 1968.
115. Tsou P.J., Rich A.E.: *Phytopath.*, 57; 345 (Abstr.). 1967.

116. Verma V.S., Raychandhuri S.P.: *Naturwissenschaften* 55(11); 546. 1968.
117. Vine S.J.: *Hort. Sci.*, 43; 293—297. 1968.
118. Wajda L.: *Acta Biol. Cracov. S. Bot. V.* 9; 13—30. 1966.
119. Walkey D.G.A.: *J. Hort. Sci.*, 43; 283—287. 1968.
120. Walkey D.G.A., Webb M.J.A.: *J. gen. Virol.*, 3; 311—313. 1968.
121. Walkey D.G.A., Fitzpatrick J., Woolfitt J.M.G.: *J. gen. Virol.*, 5; 237—241. 1969.
122. Warmke H.E., Warmke G.L.: *Am. J. of Bot.*, V. 37; 272—280, 1950.
123. Wood G.A.: *N. Z. Journal of Agric. Res.*, 16; 255—262. 1973.
124. Wright N.S.: *Seed Improvement Symp. 51 Ann. Meeting Potato Assoc. of America.* 1967.
125. Zaklukiewicz K.: *Biul. Inst. Ziemn.*, N. 7; 69—17. 1971.
126. Zaklukiewicz K., Budnik J.: *Potato Res.* 18; 608—617. 1975.