

TERMOTERAPIA I CHEMIOTERAPIA – PORÓWNANIE SKUTECZNOŚCI METOD W ELIMINACJI WIRUSÓW S I M ZIEMNIAKA

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska, mgr inż. Joanna Piskorz
IHAR PIB, Pracownia Zasobów Genowych i Kultur in Vitro w Boninie
e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

Streszczenie

W latach 2014-2015 prowadzono badania nad uwalnianiem roślin ziemniaka od wirusów przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z izolacją merystemów i chemioterapii. Procent roślin uzyskanych z wyizolowanych merystemów zwiększał się w zależności od terminu izolowania i był znacznie wyższy w okresie korzystnym dla wzrostu i rozwoju roślin, tj. od maja do sierpnia. Wykazano istotne różnice między terminami izolowania i brak istotnych różnic pomiędzy genotypami. Rybawiryne (RBV) dodana do pożywki w dawce 20 mg/l w 100% uzdrowiła wyszczepione eksplantaty badanego genotypu porażonego wirusem S, ale równocześnie miała negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin in vitro. Niższe dawki rybawiryny (10 i 15 mg/l) w 60-80% uwolniły badany genotyp od wirusa S i nie miały tak negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin in vitro. Zieleń malachitowa (ZM) dodana do pożywki w różnych dawkach nie miała wpływu na eliminację wirusa S z badanej odmiany. Analiza wariancji danych dla roślin in vitro porażonych wirusem S wykazała istotne różnice w zależności od zastosowanych antymetabolitów oraz ich dawek. W eliminacji wirusa M zastosowanie rybawiryny jak i zieleni malachitowej nie miało wpływu na obniżenie ekstynkcji i nie wyeliminowało patogenu z badanego genotypu.

Słowa kluczowe: chemioterapia, rybawiryne, termoterapia, zieleń malachitowa, ziemniak

Uwolnione od patogenów, w tym wirusów, genotypy ziemniaka są wprowadzane do Banku Genów *in vitro*. Do pracowanie metod eliminacji wirusów ziemniaka, szczególnie S i M, z odmian gromadzonych w Banku to główny cel prowadzonych prac. Termoterapia połączona z izolacją merystemów wierzchołkowych oraz chemioterapia umożliwia uzyskanie wolnych od wirusów roślin z porażonych genotypów ziemniaka. Termoterapia może być zastosowana na etapie roślin matek, tj. przed izolacją merystemów, lub na rośliny z hodowli *in vitro*. Pierwszy wariant jest mniej szkodliwy, gdyż rośliny są silniejsze i bardziej odporne na działanie wysokich temperatur (33-37°C).

Chemioterapia może być aplikowana podobnie. Antymetabolity mogą być stosowane do podlewania lub opryskiwania roślin matek albo być dodatkiem do pożywki w hodowli *in vitro*. Najczęściej stosowanym antymetabolitem w chemioterapii jest syntetyczny analog nukleozydy purynowej – rybawiryna (= Virazole). Zalecana dawka to 10-50 mg/l pożywki (Faccioli 2001). Działanie jej polega m.in. na hamowaniu replikacji RNA i DNA niektórych wirusów, co w konsekwencji może uwolnić roślinę od wirusa. Podobnie zieleń malachitowa jest zalecana m.in. do diagnostyki *in vitro*, ale według niektórych badaczy (Norris 1954; Vasti 1973; Oshiman, Livingston 1961) może być stosowana jako chemioterapeutyk w chorobach wirusowych roślin. Przy ustalaniu dawek antymetabolitów należy wziąć pod uwagę ich działanie fitotoksyczne na rośliny, które może powodować m.in. wydłużenie czasu hodowli, a niekiedy śmierć merystemu lub roślin *in vitro*.

Materiały i metody

Termoterapia. Bulwy dwóch odmian – Korona i Tetyda – od stycznia do listopada (10 cykli) wysadzano do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczano w fitotronie w temperaturze 37/33°C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W.m², z zachowaniem 16-godzinnego fotoperiodu (fot. 1). W 5. tygodniu trwania termoterapii pobierano część pąków kątowych i izolowano merystemy. Z każdego genotypu wyizolowano po 100 merystemów. Przed izolacją materiał roślinny sterylizowano w 70-proc. etanolu przez 20 sekund, a następnie w 1,5-

-proc. roztworze chloraminy przez 15 min i 4-krotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej.



Fot. 1. Termoterapia roślin ziemniaka w fitotronie (fot. D. Sekrecka)

Z pąków wierzchołkowych i bocznych izolowano merystemy wielkości ok. 0,3 mm i umieszczano je w zestalonej agarom (0,6%) pożywce MS (Murashige, Skoog 1962) z dodatkiem 0,04 mg/l kinetyny i 0,1 mg/l kwasu giberelinowego GA₃ (MS2) lub bez tych dodatków (MS1). Co 7 dni prowadzono obserwacje wyszczepionych merystemów i oceniano ich tempo wzrostu. Probówki z merystemami utrzymywano w fitotronie w optymalnych warunkach dla ich wzrostu i rozwoju, tj. 16 godzin na świetle w temperaturze 22°C i 8 godzin w ciemności w temperaturze 20°C. Dla stymulacji kiełkujące merystemy sukcesywnie przeszczepiano na świeżą pożywkę.

Chemioterapia. Rośliny *in vitro* 2 genotypów: Linzer Starke (porażony wirusem S ziemniaka >2,000) i TE-1 (wirus M ziemniaka – 0,918) poddano działaniu antymetabolitów. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem witamin, sacharozy i agaru. Odczyn pH pożywki ustalono na poziomie 5,8. Podłoże wyjaławiano w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu sterylizacji (temperatura 121°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 min). Do sterylnej pożywki za pomocą filtrów strzykawkowych dodano ustalone dawki rybawiryny (RBV) – 10, 15 i 20 mg/l i zieleni malachitowej (ZM) – 0,02, 0,03 i 0,04 mg/l. Obiekt kontrolny stanowiła pożywka bez dodatku antymetabolitów.

Wszystkie kultury in vitro prowadzono w fitotronie w temperaturze 22-20°C, przy 16-godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m² przez okres 4-5 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin in vitro, tj. stopień ukorzenia, wysokość roślin, ulistnienie oraz współczynnik rozmnażania. W 5. tygodniu z każdej kombinacji wysadzano po 10 roślin w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4 tygodniach rośliny badano testem DAS ELISA na obecność wirusów.

Doświadczenie wykonano w pięciu powtórzeniach. Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą analizy warian-

cji. Istotność różnic oceniono testem Tukeya przy p = 0,05.

Wyniki i dyskusja

W cyklach I–X z roślin odmian Korona i Tetyda poddanych termoterapii izolowano po ok. 100 merystemów. Procent roślin uzyskanych z wyizolowanych merystemów zwiększał się w zależności od terminu izolowania i był znacznie wyższy w okresie korzystnym dla wzrostu i rozwoju roślin tj. od maja do sierpnia. Te same genotypy, z których izoluje się merystemy w styczniu lub lutym, dają zdecydowanie niższy procent roślin in vitro (tab. 1).

Tabela 1

Procent roślin in vitro uzyskanych z merystemów poddanych termoterapii w zależności od terminu izolowania (styczeń-wrzesień)

Genotyp	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Średnia
Korona	0,85	4,69	7,44	10,13	18,0	20,0	28,0*	32,0*	35,0*	17,35
Tetyda	2,84	3,75	6,12	9,46	12,0	22,0	26,0*	28,0*	41,0*	16,80
Średnia	1,85	4,22	6,78	9,80	15,0	21,0	27,0*	30,0*	38,0*	17,07

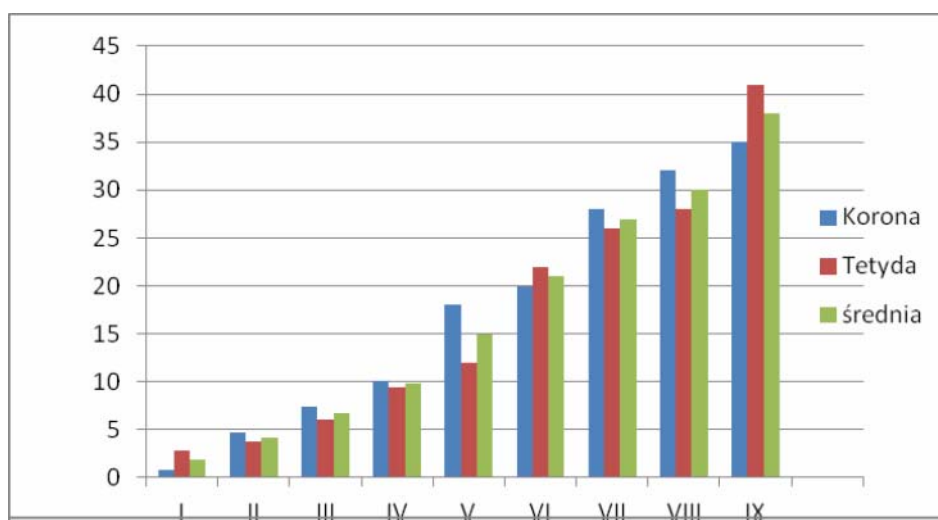
* kielkujące merystemy

Dodatek kinetyny (0,04 mg/l) i kwasu gibberelinowego GA₃ (0,1 mg/l) do pożywki MS2, na którą wykładano merystemy, nie miał istotnego wpływu na ich wzrost i rozwój. Podobnie rosły merystemy na pożywce MS1 (bez tych dodatków). W związku z tym należy zrezygnować z dodawania do pożywek dodatkowych substancji wzrostowych, ponieważ mogą one mieć wpływ na wystąpienie niepożądanych mutacji.

Pierwsze rośliny in vitro z merystemów uzyskano na przełomie czerwca i lipca (po 5 miesiącach). Z małych merystemów (maks. z 2 zawiązkami), a takie są izolowane z roślin porażonych wirusami, tylko ok. 20% może przeżyć. Uzyskanie zdrowych roślin jest

jeszcze trudniejsze i wynosi ok. 10% (w zależności od wirusa).

Analiza wariancji danych z doświadczenia dwuczynnikowego, bezpowtórzeniowego, wykazała istotne różnice między terminami izolowania w teście Tukeya (p = 0,05), brak natomiast istotnych różnic pomiędzy badanymi genotypami (rys. 1). Termoterapia roślin powinna być więc przeprowadzona na przełomie wiosny i lata, tj. w okresie korzystnym dla wzrostu roślin. W czasie przypadającym na naturalną wegetację roślin ziemniaka (kwiecień-wrzesień) procent uzyskanych roślin in vitro z merystemów jest znacznie wyższy i dochodzi do 30.



Rys. 1. Procent roślin uzyskanych w poszczególnych terminach izolowania – styczeń-wrzesień – odmiany Korona i Tetyda

Chemioterapia. Rybawiryna (RBV) dodana do pożywki w dawce 20 mg/l w 100% uzdrowiła wyszczepione eksplantaty porażone wirusem S ziemniaka, ale miała negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Były one znacznie słabsze od roślin kontrolnych i tworzyły słabe korzenie (fot. 2). Niższe dawki rybawiryny (10 i 15 mg/l) w 60-80% uwolniły badany genotyp od wirusa S i nie

miały tak negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Dodatek do pożywki różnych dawek zieleni malachitowej (ZM) nie miał wpływu na eliminację wirusa S z badanego genotypu. Eksplantaty wyszczepione na pożywkę z zielenią malachitową rosły prawidłowo i nie wykazywały żadnych negatywnych objawów (tab. 2, rys. 2a i 2b).

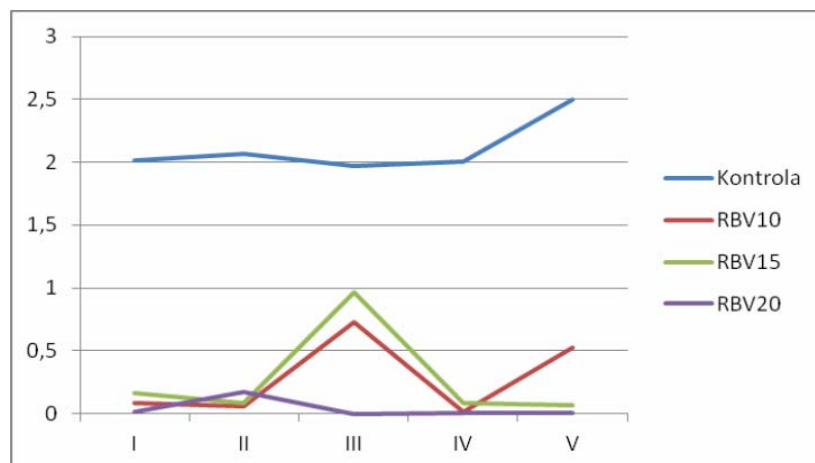


Fot. 2. Wpływ rybawiryny na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Po prawej stronie obiekt kontrolny (fot. J. Piskorz)

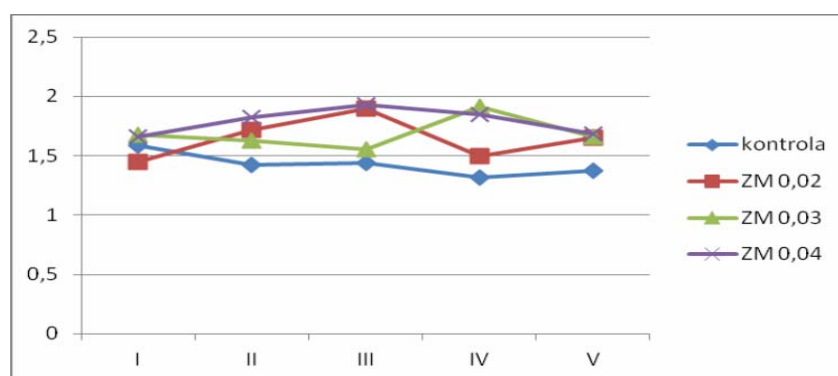
Tabela 2

Poziom ekstynkcji wirusa S ziemniaka w roślinach *in vitro* poddanych chemioterapii

Kombinacja	I seria	II seria	III seria	IV seria	V seria	Procent porażenia
Kontrola	2,017	2,065	1,966	2,005	2,500	100
RBV 10	0,086	0,056	0,726	0,011	0,525	40
RBV 15	0,160	0,081	0,961	0,084	0,064	20
RBV 20	0,011	0,169+/-	0,000	0,006	0,003	0
ZM 0,02	1,447	1,714	1,898	1,495	1,655	100
ZM 0,03	1,675	1,628	1,551	1,916	1,660	100
ZM 0,04	1,664	1,822	1,929	1,851	1,682	100



Rys. 2a. Średni poziom ekstynkcji wirusa S ziemniaka na skutek działania różnych dawek rybawiryny



Rys. 2b. Średni poziom ekstynkcji wirusa S ziemniaka na skutek działania różnych dawek zieleni malachitowej

W wyniku analizy wariancji danych z doświadczenia pojedynczego 2-czynnikowego w układzie równoważnych podbloków dla roślin in vitro porażonych wirusem S ziemniaka i poddanych chemioterapii uzyskano istotne różnice w zależności od zastosowa-

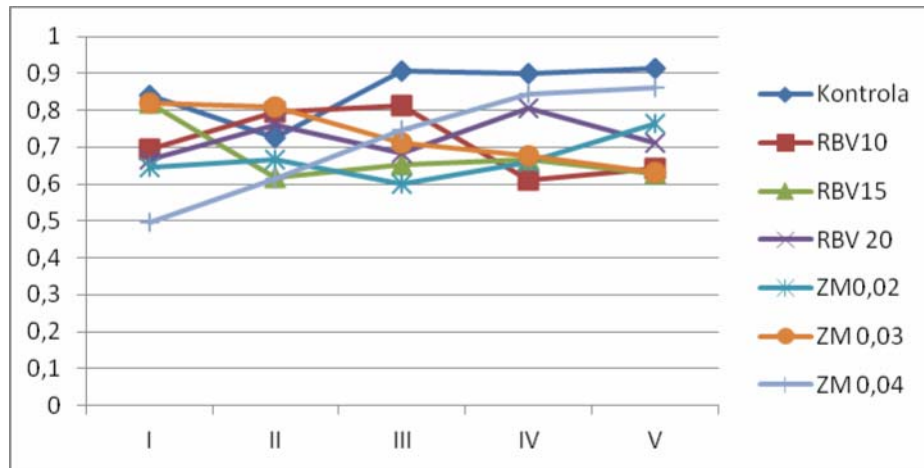
nych antymetabolitów oraz ich dawek.

W eliminacji wirusa M ziemniaka zastosowanie rybawiryny i zieleni malachitowej nie miało wpływu na obniżenie jego ekstynkcji i nie wyeliminowało patogenu z badanego genotypu (tab. 3, rys. 3).

Tabela 3

Poziom ekstynkcji wirusa M ziemniaka w roślinach in vitro genotypu TE-1 poddanych chemioterapii

Kombinacja	I seria	II seria	III seria	IV seria	V seria	Procent porażenia
Kontrola	0,840	0,725	0,905	0,899	0,912	100
RBV 10	0,696	0,795	0,814	0,610	0,643	100
RBV 15	0,821	0,617	0,651	0,668	0,628	100
RBV 20	0,666	0,760	0,685	0,805	0,712	100
ZM 0,02	0,644	0,665	0,602	0,660	0,765	100
ZM 0,03	0,818	0,810	0,710	0,678	0,633	100
ZM 0,04	0,497	0,614	0,748	0,845	0,862	100



Rys. 3. Średni poziom ekstynkcji wirusa M ziemniaka po zastosowaniu różnych dawek rybawiryny i zieleni malachitowej

Przez lata wielu badaczy testowało różne substancje chemiczne, ale tylko kilka okazało się w miarę skutecznych (Faccioli 2001). Wśród chemioterapeutyków stosowanych w chemioterapii roślin rybawiryna zyskała największą popularność (Zenkter 1998). Planując badania, musimy wziąć pod uwagę to, że poziom zawartości substancji antywirusowych w pożywce musi być kompromisem pomiędzy skutecznością oddziaływania substancji na wirusy a jej wpływem na wzrost i rozwój roślin w kulturach *in vitro*. Zbyt wysokie stężenia substancji antywirusowych może być fitotoksyczne lub hamować regenerację i wzrost kultur. W naszych badaniach wyższa dawka rybawiryny (20 mg/l) w 100% uwolniła odmianę Linzer Starke od wirusa S, ale jednocześnie negatywnie wpłynęła na wzrost i rozwój roślin. Niższe dawki rybawiryny oznaczają mniejszy procent wolnych od wirusa S roślin *in vitro*. Jeśli chodzi o wirus M, żadna z badanych substancji nie poradziła sobie z jego eliminacją.

Wnioski

1. Termoterapia roślin wyrosłych z bulw matek pozwala na izolację silniejszych merystemów i w rezultacie uzyskuje się więcej roślin *in vitro* (średnio 18%).

2. Najkorzystniejszy do przeprowadzenia termoterapii i izolowania merystemów jest okres od kwietnia do września.

3. Zastosowane dawki rybawiryny eliminowały wirus S ziemniaka z badanego genotypu.

4. Dodanie do pożywki zieleni malachitowej nie miało wpływu na eliminację wirusa S.

5. Skuteczność oddziaływania rybawiryny i zieleni malachitowej dodanych do pożywki na rośliny *in vitro* porażone wirusem M była bardzo niska; dodatki te nie wyeliminowały cząstek wirusa.

Literatura

1. Faccioli G. 2001. Control of potato Viruses using Meristem and Stem-cutting Cultures, Thermo-therapy and Chemotherapy. [In:] Virus and virus-like disease of potatoes and production of seed potatoes. Loebenstein G., Berger P. H., Brunt A., Lawson R. H. (Eds.). Kluwer Acad. Publ. Dordrecht: 382-385;
2. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. – *Physiol. Plant.* 15: 473-479;
3. Norris D. O. 1954. Development of virus-free stock of Green Mountain Potato by treatment with malachite green. – *Australian J. Agric. Res.* 5: 658-663;
4. Oshiman N., Livingston C. H. 1961. The effects of antiviral chemicals on potato virus X. – *Am. Potato J.* 38: 294-299;
5. Vasti S. M. 1973. Effect of antiviral chemicals on production of virus X free potato tubers. – *Pakistan J. Bot.* 5(2): 139-142;
6. Zenkter E.K. 1998. Współczesne metody wykrywania i eliminowania drobnoustrojów podczas mikrorozmnażania. – *Biotechnologia* 1(40): 149-166