

ZDROWOTNOŚĆ ZASOBÓW GENOWYCH ZGROMADZONYCH I UDOSTĘPNIANYCH Z BANKU GENÓW *IN VITRO* ZIEMNIAKA W BONINIE

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska, mgr inż. Anna Krzewińska
IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie
e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

Głównym założeniem utworzenia i prowadzenia Banku Genów ziemniaka w Boninie było i jest gromadzenie oraz utrzymywanie zasobów ziemniaka *in vitro* w stanie żywym i wolnym od patogenów. Zasoby genowe *in vitro* są m.in. wykorzystywane w hodowli zachowawczej, dostarczając materiał umożliwiający poprawę zdrowotności sadzeniaków oraz skrócenie cyklu produkcji polowej w celu uzyskania odpowied-

niej ilości materiału w pierwszym etapie produkcji nasiennej. Zasoby te stanowią także materiał genetyczny dla reaktywowania odmian, które znalazły się w kręgu zainteresowania odbiorców (np. stare polskie odmiany dla gospodarstw ekologicznych). Istotne znaczenie ma również wykorzystanie zasobów *in vitro* ziemniaka w pracach badawczych, m.in. w badaniach genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych.

Do uwalniania roślin od uporczywych patogenów stosuje się hodowlę merystemów wierzchołkowych pędów w połączeniu z innymi metodami zwalczania wirusów roślinnych, tj. termoterapią, chemioterapią, krioterapią, a niekiedy i elektroterapią (Zenkter 2001). Termoterapia to traktowanie roślin podwyższoną temperaturą (32-40°C) przez kilka dni do kilku miesięcy, natomiast krioterapia (rzadziej stosowana) – głębokie zamrażanie (w ciekłym azocie) fragmentów roślin. W chemioterapii stosuje się analogi metabolitów roślinnych, które zakłócają cykl rozwojowy wirusów, co ułatwia uwalnianie roślin od patogenów. W elektroterapii wykorzystuje się do leczenia chorób wirusowych impulsy pola elektrycznego (metoda opatentowana na Kubie).

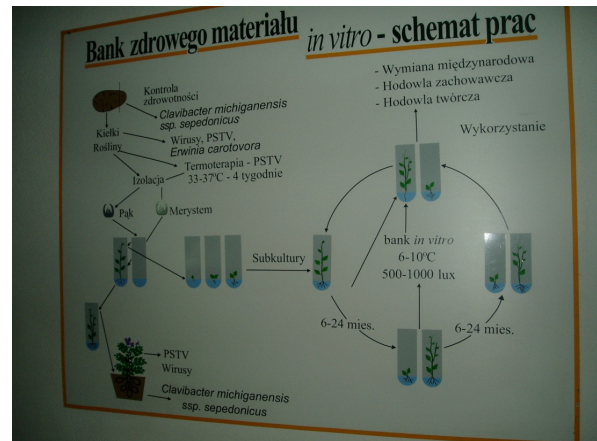
Celem pracy jest ukazanie zagadnień związanych ze zdrowotnością zasobów genowych ziemniaka zgromadzonych w Banku *in vitro*.

Uwalnianie roślin ziemniaka od patogenów z zastosowaniem kultur *in vitro*

Przed umieszczeniem genotypu w Banku Genów materiał przechodzi terapię „uzdrawiająca”, a następnie testy potwierdzające jego zdrowotność (fot. 1). Pierwszym etapem jest kontrola obecności bakterii bakteriozy pierścieniowej (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Cms*) i śluzaka (*Ralstonia solanacea*, *Rsol*) w bulwach. Część stolonowa bulwy jest przekazywana do Pracowni Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka w oddziale IHAR-PIB w Bydgoszczy i badana metodą pośredniej immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych (*Cms*, *Rsol*) i monoklonalnych (*Cms*). Wolne od bakterii bulwy są wysadzone do pojemników z substratem torfowym.

Bezpośrednio po wschodach rośliny ziemniaka są poddawane termoterapii, tj. umieszczane w specjalnie skonstruowanej szafie utrzymującej odpowiednią temperaturę i wilgotność (fot. 2). Przez 4 do 8 tygodni rośliny doświetla się światłem jarzeniowym o natężeniu ok. 4500 lx, w cyklu dzień/noc 16/8 h i temperaturze odpowiednio 37/33°C. W 3. tygodniu wzrostu z każdego genotypu są pobierane próby liści do testów na obecność wiroidu wrzecionowatości bulw ziem-

niaka (PSTVd) za pomocą elektroforezy ewentualnie testu PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy). W zależności od kondycji roślin poddanych termoterapii po 4 lub 8 tygodniach z roślin pobierane są pąki wierzchołkowe i boczne. Odkażone chloraminą wierzchołki umieszcza się w kropli sterylnej wody na płytce Petriego, a następnie pod mikroskopem, za pomocą igły preparacyjnej i skalpela, izoluje się merystemy wielkości 0,1-1,0 mm.



Fot. 1. Schemat prac nad uwalnianiem roślin ziemniaka od patogenów za pomocą kultur *in vitro* (fot. D. Sekrecka)



Fot. 2. Termoterapia roślin ziemniaka (fot. D. Sekrecka)

Uzyskanie roślin z merystemów wierzchołkowych, zbudowanych z tkanki twórczej, pierwotnej, odpowiedzialnej za wzrost i różnicowanie organów umożliwiają kultury *in vitro*. Merystemy są umieszczane pojedynczo w probówkach na pożywce Murashige-Skooga (1962) zestalonej agarem. Pojemniki z merystemami przebywają w fitotronie hodowlanym nawet do 6 miesięcy (tempera-

tura 16-20°C, dobowy cykl dzień/noc 16 /8 h, natężenie światła ok. 3000 lx). Proces regeneracji jest długotrwały i pierwsze rośliny *in vitro* uzyskujemy po 2-6 miesiącach. Duże znaczenie ma precyzyjne cięcie eksplantatów oraz umieszczenie ich na pożywce w taki sposób, aby powierzchnia cięcia przylegała do pożywki.

Aby uniknąć zwiędnięcia wrażliwych na wysychanie tkanek merystematycznych, zaleca się ich szybki transfer na pożywkę. W przypadku uszkodzenia tkanki niewłaściwym cięciem lub zbyt późnym umieszczeniem merystemu na pożywce może dojść do obumarcia merystemów. Uszkodzenie merystemu powoduje nadmierny wzrost korzeni, przy słabym wydłużaniu się pędu, lub two-

zenie się kallusa zamiast regeneracji pędu. Bardzo niekorzystne jest pozostawienie zbyt dużego fragmentu merystematycznych tkanek pędu, gdyż zmniejsza to szanse na eliminację patogenów bakteryjnych i wirusowych.

W latach 2008-2013 przeprowadzono badania nad wpływem termoterapii i wielkości izolowanych merystemów na zdrowotność genotypów. Wyniki wykazały (dane niepubl.), że łatwiej uzyskać rośliny z merystemów większych, mających większą liczbę zawiązków liści (2-4), niż z małych (tylko kopała merystematyczna). Z drugiej strony jednak, z większych eksplantatów trudniej uzyskać rośliny wolne od wirusów (tab. 1).

Tabela 1

Wpływ wielkości izolowanych merystemów na liczbę uzyskanych roślin *in vitro* ziemniaka i ich zdrowotność (średnia z lat 2009-2013)

| Wielkość merystemów | Liczba merystemów | | Liczba kultur zbadanych na obecność wirusów testem ELISA | | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|--|---------------|----------|
| | wyzolowanych | rozwijających się | ogółem | wolne | porażone |
| I – kopała merystematyczna | 450 | 105/23% | 50 | 35/70% | 15 |
| II – kopała + zawiązki 2 liści | 450 | 210/47% | 50 | 24/48% | 26 |
| III – Kopała + zawiązki 4 liści | 450 | 323/72% | 50 | 11/22% | 39 |

Źródło: badania własne

Na podstawie wykonanych badań można stwierdzić, że małe merystemy izolowane z pąków kątowych i szczytowych roślin poddanych termoterapii dają największe szanse na uzyskanie zdrowych roślin (70% zdrowych kultur). Izolowanie merystemów z zawiązkami 2 lub 4 liści jest zalecane jedynie w przypadku wprowadzania do banku zdrowego i sprawdzonego testem genotypu. Największe trudności z odwirusowaniem sprawia wirus S ziemniaka, najczęściej stwierdzany w badanych kulturach. Ponowna termoterapia (roślin w warunkach *in vitro*) i/lub ewentualne zastosowanie chemioterapii i ponowna izolacja merystemów pozwalają na uzyskanie zdrowych kultur.

Kontrola zdrowotności roślin pochodzących z Banku

Przystąpienie Polski do Unii Europejskiej na zasadach równości, jednakowych praw i obowiązków pozwala polskim producentom rolnym oraz handlowcom na swobodny obrót materiałem roślinnym w obrębie wszystkich krajów rozszerzonej Wspólnoty (<http://piorin.gov.pl>. GI-WNF 2012). Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa sprawuje kontrolę i nadzór fitosanitarny nad produkcją roślinną i obrotem materiałem roślinnym, ze szczególnym naciskiem na miejsce produkcji lub wytwarzania materiału rozmnożeniowego. Potwierdzeniem zdrowotności materiału, a szczególnie uwolnienia od organizmów kwarantannowych, jest zaopatrzenie go w paszport roślin.

Paszport roślin jest wymagany podczas przemieszczania się materiału roślinnego zarówno w obrębie danego kraju, jak i do innych państw członkowskich UE (<http://piorin.gov.pl>. PIORIN 2012). W tym celu materiał genetyczny zgromadzony w Banku Genów Ziemiaka *in vitro* przechodzi wiele kontroli zdrowotności: wstępną – badanie pod kątem występowania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (*Cms*) i śluzaka (*Rso*) oraz kolejne – na obecność wirusów. Do wykrywania wirusów służy enzymatyczny test ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), powszechnie dziś stosowany w diagnostyce chorób wirusowych. Rośliny otrzymane z merystemów *in vitro* wysadza się do pojemników z substratem torfowym i przygotowuje do badania. W warunkach szklarniowych ewentualne cząstki wirusa pozostające w roślinie *in vitro* mogą namnożyć się przed wykryciem podczas testu ELISA, dlatego też każdy genotyp przed umieszczeniem go w Banku Genów jest co najmniej 2-5-krotnie przebadany testem ELISA na obecność najczęściej występujących wirusów ziemniaka (A, X, S, M, Y i liściozwoju).

Postęp w badaniach podstawowych z zakresu biologii molekularnej spowodował wzrost zainteresowania nowoczesnymi metodami diagnostycznymi. Technika PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) zyskuje w ostatnich latach dużą popularność ze względu na jej czułość. Nie wymaga dużej ilości materiału, a przeprowadzenie testu zajmuje stosunkowo mało czasu. Jak każda metoda ma również swoje wady. Są to m.in. bardzo wysoki koszt testu (ok. 500 zł dla 1 rośliny), łatwość kontaminacji próbek oraz zdarzające się problemy z powtarzalnością wyników. Zbyt duża czułość testów może być również przyczyną niewłaściwej interpretacji wyników

badania, ze względu na możliwość wystąpienia fałszywie pozytywnych wyników, a w konsekwencji nieuzasadnionej dyskwalifikacji materiału rozmnożeniowego (Łojkowska 2001; Łojkowska, Śledź 2012).

Jesienią 2013 r. część genotypów poddano, pomimo wysokich kosztów, badaniom na wirusy techniką PCR. Badania wykonane w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii potwierdziły w 100% ich zdrowotność. Obecnie, właśnie ze względu na bardzo wysokie koszty, testy oparte na PCR nie mogą być wprowadzone do powszechnej diagnostyki materiałów w Banku Genów *in vitro*. Od 2003 r., w związku z wprowadzeniem do praktyki „Specjalnego programu działań w zakresie zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*)”, wszystkie genotypy pobierane z Banku Genów przed przekazaniem na zewnątrz są poddawane dodatkowym badaniom w Centralnym Laboratorium GIO-RiN w Toruniu. Wystawienie paszportu dla przygotowanego materiału rozmnożeniowego jest potwierdzeniem jego zdrowotności.

Literatura

1. **Łojkowska E. 2001.** Diagnostyka molekularna roślin. [W:] Biotechnologia roślin. Pr. zbior. pod red. S. Malepszego. Wyd. Nauk. PWN Warszawa: 462-484;
2. **Łojkowska E., Śledź W. 2012.** Wykrywanie i identyfikacja czynników wywołujących choroby Roślin. [W:] Biotechnologia roślin. Pr. zbior. pod red. S. Malepszego. Wyd. Nauk. PWN Warszawa: 247-272;
3. **Murashige T., Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. – *Physiol. Plant.* 15: 473-479;
4. **Zenktele E. 2001.** Kultura merystemów i uwalnianie roślin od wirusów. [W:] Biotechnologia roślin. Pr. zbior. pod red. S. Malepszego. Wyd. Nauk. PWN Warszawa: 33-42;
5. **<http://piorin.gov.pl/index.php>** Obrót ziemniakami (2012). PIORIN, Wyd. Nadzoru Fitosanit. piorin.gov.pl