

TERMOTERAPIA JAKO METODA ELIMINOWANIA WIRUSÓW S I M Z ROŚLIN ZIEMNIAKA W KULTURACH IN VITRO

THERMOTHERAPY – A METHOD OF ELIMINATING S AND M VIRUSES FROM POTATO PLANTS IN *IN VITRO* CULTURES

mgr inż. Dorota Michałowska, mgr inż. Oksana Olejnik
mgr inż. Katarzyna Salamońska, inż. Danuta Sekrecka
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl

Streszczenie

Wirusy S i M stanowią duże zagrożenie w hodowli ziemniaka, gdyż liczba chorych roślin wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego. Termoterapia połączona z hodowlą tkanek merystematycznych to jedna z metod eliminowania wirusów z roślin *in vitro* ziemniaka. Polega ona na traktowaniu wysoką temperaturą (33-45°C) roślin lub eksplantatów. W wyniku działania podwyższonej temperatury następuje aktywacja genów wyciszających wirus.

Słowa kluczowe: *in vitro*, merystem, termoterapia, wirusy ziemniaka, ziemniak

Abstract

Potato virus S and potato virus M both pose a significant threat in potato culture, as the number of diseased plants increases in successive tuber generations as a result of vegetative reproduction. Thermotherapy, combined with the cultivation of meristems, is one of the most widely used methods of eliminating viruses from potato plants *in vitro*. It involves treating plants or explants with high temperature (33-45°C). As a result of the increased temperature, the virus silencing genes are activated.

Keywords: *in vitro*, meristem, potato, potato virus, thermotherapy

Podstawowym celem utworzenia i prowadzenia Banku Genów Ziemniaka w Boninie było gromadzenie i przechowywanie zasobów *in vitro* w stanie żywym i wolnym od patogenów, w tym od wirusów. Choroby wirusowe stanowią główną przyczynę złej jakości sadzeniaków, prowadzą do degeneracji plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty plonu. Dlatego nie-

zmiernie ważne jest usunięcie wirusów z zainfekowanych roślin (Faccioli 2010) i utrzymywanie zdrowego materiału wyjściowego w kulturach *in vitro*.

Do uwalniania roślin od wirusów wykorzystuje się kilka technik: kulturę merystemów, termoterapię, chemioterapię, krioterapię i elektroterapię.

Opracowanie skutecznej metody eliminowania wirusa S (PVS) i M (PVM) z porażonego materiału wprowadzanego do banku genów jest jednym z ważniejszych zadań w ramach prac prowadzonych przez laboratorium kultur tkankowych w Boninie. Do uzyskania zdrowego materiału wyjściowego stosuje się m.in. metodę termoterapii połączoną z hodowlą tkanek merystematycznych.

Termoterapia polega na długotrwałym traktowaniu roślin podwyższoną temperaturą (33-45°C), w efekcie czego miano wirusa w roślinie spada nawet do całkowitej jego nieobecności. Zjawisko uwalniania roślin od wirusów za pomocą ciepła odkryte zostało w latach 30. XX w. (Kunkel 1936).

Materiały i metody

Bulwy dwóch odmian: Latest 16-159 porażone PVM oraz Leonata porażone PVS wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w komorze termoterapijnej utrzymującej odpowiednią temperaturę i wilgotność (fot. 1 i 2). Przez kilka tygodni (4-8) rośliny były doświetlane światłem jarzeniowym o natężeniu 10 W/m², z zachowaniem fotoperiodu 16 godzin dzień w temperaturze 38°C i 8 godzin noc w temperaturze 33°C. W zależności od kondycji roślin poddanych terapii pobierane były pąki wierzchołkowe i boczne, z których izolowano merystemy wielkości od 0,1 do 0,4 mm. Przed wyizolowaniem merystemów materiał roślinny odkażano w 70-proc. etanolu przez 20 sekund, a następnie w 1,5-proc. roztworze chloraminy przez 15 minut.

Kolejna czynność to 4-krotne płukanie

fragmentów roślin w sterylnej destylowanej wodzie. Odkażony materiał roślinny umieszczano w kropli sterylnej wody na płycie Petriego, a następnie pod mikroskopem, za pomocą igły preparacyjnej i skalpela, izolowano merystemy. Pąki szczytowe i kątowe zostały podzielone między dwóch wykonawców i uzyskano 233 merystemy.

Co 7 dni prowadzono obserwacje wyszczepionych merystemów, usuwając ewentualne zakażenia grzybowo-bakteryjne, i oceniano ich tempo wzrostu. Probówki z merystemami utrzymywano w fitotronie w optymalnych dla ich rozwoju warunkach, tj. 16 godzin na świetle 8 W/m² w temperaturze 22°C oraz 8 godzin w ciemności w temperaturze 20°C. W celu stymulacji kiełkujące merystemy sukcesywnie przeszczepiano na świeże podłoże. Proces regeneracji jest długotrwały; pierwsze rośliny in vitro uzyskano po 6 miesiącach, wysadzono je do doniczek z substratem torfowym, a następnie, po ok. 4 tygodniach, badano testem DAS ELISA na obecność wirusów.

Wyniki

Procent otrzymanych roślin in vitro, w tym uwolnionych od wirusa, jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów, był zależny m.in. od wykonawcy (tab. 1). Z odmiany zainfekowanej wirusem M uzyskano od 26,4 do 16% zdrowych roślin in vitro w zależności od wykonawcy. Większy problem jest z uwalnianiem wirusa S, dlatego izolowano w miarę możliwości tylko kopułę merystematyczną. W zależności od wykonawcy uzyskano od 16,2 do 8% roślin wolnych od PVS (tab. 1).

Tabela 1

Procent roślin in vitro uzyskanych z merystemów w zależności od wirusa i wykonawcy

Odmiana	Wykonawca	Liczba wyizolowanych merystemów	Liczba uzyskanych roślin in vitro	Procent	Liczba uwolnionych od wirusa roślin in vitro	Procent
Latest 16-159 (PVM)	1	53	36	68	14	26,4
	2	50	15	30	8	16
Leonata (PVS)	1	80	46	57,5	13	16,2
	2	50	19	38	4	8



Fot. 1 i 2. Termoterapia odmian ziemniaka przed wprowadzeniem ich do banku genów (fot. D. Michałowska)

Dyskusja

Przez lata wielu badaczy próbowało znaleźć sposób na wyeliminowanie wirusów z roślin. Już w 1952 r. ukazały się w literaturze pierwsze informacje o tym, że wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane z nich merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin 1952). Zjawisko eliminacji wirusów w całych roślinach pod wpływem wysokiej temperatury po raz pierwszy zostało opisane przez amerykańskiego badacza Kunkela (1936). Kolejne badania wykazały, że liczba roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam, Tedesse 2008). Jednocześnie zmniejsza się liczba eks-plantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Ali i in. 2013).

Merystemy nie mają połączenia z systemem naczyniowym rośliny, za pomocą którego rozprzestrzeniają się wirusy. Dlatego po ich wypreparowaniu otrzymuje się eks-plantaty o najniższej koncentracji patogenów (Panattoni 2013). Na uzyskane wyniki wpływa staranność wykonawców w izolowaniu merystemów. Im mniejszy wyizolowany merystem, tym większe prawdopodobieństwo uzyskania roślin zdrowych. Duże znaczenie ma precyzyjne cięcie eks-plantatów i szybkie umieszczenie ich na pożywce w taki sposób, aby powierzchnia cięcia przylegała do podłoża. W przypadku uszko-

dzenia tkanki lub zbyt późnego umieszczenia merystemu na pożywce można doprowadzić do ich obumierania.

Przeprowadzone badania potwierdziły, jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin in vitro ma czynnik ludzki. 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) – tabela 1.

Wnioski

1. Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa S i M ziemniaka poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na co składa się precyzja wykonania i wielkość izolowanego merystemu.
2. Kultura merystemów w połączeniu z termoterapią jest obecnie standardowo stosowana w celu uzyskania zdrowych, wolnych od patogenów roślin ziemniaka.

Literatura

1. Ali M. A., Nasiruddin K. M., Haque M. S., Faisal S. M. 2013. Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARC. J. Agric. 11(1): 71-80;
2. 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;
3. Faccioli G. 2001. Control of potato viruses using meristem culture and

stem-cutting cultures. Thermotherapy and chemotherapy. [In:] Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Loebenstein G. i in. (eds.). Kluwer, Dordrecht: 365-390; **4. Kunkel L. O. 1936.** Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. – Phytopathology 26: 809-830; **5. Morel G., Martin C. 1952.** Cure of dahlias

attacked by a virus disease. C.R. Hebd Seances Acad.Sci. 235(21): 1324-1325; **6. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. 2013.** Review of viruses in plants: twenty years of Progress. – Span. J. Agric. Res. 11(1): 173-188; **7. Za-klukiewicz K. 1082.** Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. – Ziemniak 1981/82: 137-160

