

Zadanie 1.17. Opracowanie technologii produkcji odwirusowanych sadzonek warzyw z zastosowaniem kultur tkanek

Okres realizacji: 2008-2014

Kierownik zadania: **prof. dr hab. Krystyna Górecka**

Wykonawcy: dr W. Kiszczak, mgr U. Kowalska, dr T. Malinowski

Celem doświadczeń było poszukiwanie optymalnego składu pożywki do ukorzenia roślin chrzanu i rabarbaru, badanie procesu adaptacji oraz oznaczanie wirusów w tych roślinach.

Zastosowano następujące pożywki ukorzeniające:

Pożywka 1: ½ MS, 20 g/l sacharozy, 1 mg/l NAA, 1 mg/l IBA

Pożywka 2: ½ MS, 20 g/l sacharozy, 3 mg/l NAA

Pożywka 3: MS, 20 g/l sacharozy, 3 mg/l NAA

Pożywka 4: MS, 30 g/l sacharozy, 3 mg/l NAA

Adaptację roślin chrzanu i rabarbaru otrzymanych *in vitro* prowadzono w dwóch podłożach będących mieszaniną torfu i piasku w stosunku 1:3 i 3:1 z dodatkiem Azofoski 1,2 kg/ m⁻³ i kredy 10 kg/ m⁻³ i poddawano adaptacji w foliowym tuneliku.

Podjęto też próby intensyfikacji namnażania *in vitro* obu roślin stosując jako eksplantaty wyjściowe otrzymane *in vitro* rozety i liście oraz używając pożywek z różnymi cytokininami.

Rośliny, które stanowiły materiał wyjściowy do zakładania były badane na obecność niżej wymienionych wirusów:

1. Wirus mozaiki rzepy (*Turnip mosaic virus*, TuMV)
2. Wirus mozaiki gęsiówki (*Arabis mosaic virus*, ArMV)
3. Wirus mozaiki kalafiora (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)
4. Wirus pierścieniowej plamistości tytoniu (*Tobacco ring spot virus*, TRSV)
5. Wirus mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

Wszystkie rośliny były badane testem ELISA z wykorzystaniem odczynników zakupionych w firmie Bioreba. W testach na obecność CMV wykorzystano także dodatkowo specyficzne odczynniki przygotowane wcześniej w Instytucie Sadownictwa i Kwaciarstwa (obecnie Instytut Ogrodnictwa). Dla porównania zakupiono także zestaw ELISA z firmy Loewe do wykrywania wirusa TuMV. Wybrane rośliny wykazujące charakterystyczne symptomy wskazujące na możliwość porażenia TuMV były dodatkowo badane metodą SC-RT-PCR (silicacapture – reversed transcription – polymerase chain reaction) z wykorzystaniem kilku par primerów o różnym zakresie specyficzności. Kilka roślin, dla których uzyskano jednoznacznie pozytywny wynik testu, przeniesiono do szklarni, wykorzystano do założenia kultur *in vitro* i przebadano kilkakrotnie w ciągu kilku miesięcy metodami ELISA i/lub SC-RT-PCR. Kultury są aktualnie prowadzone w celu uzyskania odpowiedniej ilości materiału roślinnego do optymalizacji procesu uwalniania roślin chrzanu od TuMV i ewentualnie innych wirusów.

Wszystkie zastosowane w tym doświadczeniu pożywki ukorzeniające pozwoliły na uzyskanie wysokiego procentu roślin ukorzenionych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najwięcej ukorzenionych rozet otrzymano na pożywce z 30 g/l sacharozy i dodatkiem 3 mg/l NAA. Procent ukorzenionych roślin na tej pożywce wynosił 83. Rośliny chrzanu i rabarbaru otrzymane *in vitro* w 100% adaptowały się do warunków zewnętrznych w obu zastosowanych podłożach. U rabarbaru na pożywce MS zawierającej BA i IAA wywołano indukcję pąków z wyłożonej rozety. Po raz pierwszy w tym doświadczeniu udało się pobudzić liście rabarbaru do regeneracji na pożywce MS z dodatkiem TDZ i NAA. Liście chrzanu, a nawet ich fragmenty wytworzyły na pożywkach MS z TDZ i NAA liczne zgrupowania zawiązków pędów. Po podzieleniu otrzymanych skupisk i przepasażowaniu na te same pożywki następowało ich dalsze namnażanie.

Wirusa mozaiki gęsiówki (ArMV) wykryto w dwóch roślinach chrzanu oznaczonych B6 (próbka 13) i B7 (próbka 14). Pozytywny wynik testu na obecność wirusa mozaiki kalafiora (CaMV) potwierdzono w dwóch powtórzeniach dla rośliny chrzanu B8 (próbka 15). Podejrzenie obecności wirusa mozaiki ogórka (CMV) stwierdzono wstępnie dla szeregu roślin badanych w testach pierwszej serii, ale w drugiej serii uzyskano dla tych samych roślin wynik negatywny. W żadnej z badanych roślin nie wykryto wirusa pierścieniowej plamistości tytoniu (TRSV). Początkowo nie wykryto także wirusa mozaiki rzepy (TuMV). Metodą ELISA uzyskano tylko w kilku przypadkach wynik pozytywny. Zastosowanie zestawu z firmy Loewe pozwoliło na poprawę czułości, jednak nadal obserwowano (zbyt) wysoki procent wyników fałszywie negatywnych, szczególnie przy badaniu młodych liści bez symptomów chorobowych. Wykonano pilotażowe doświadczenie polegające na porównaniu wyników obserwacji symptomów chorobowych na liściach chrzanu, testu ELISA oraz testu SC-RT-PCR dla prób zawierających wirusa w różnych stężeniach (szereg rozcieńczeń) oraz dla próbek pobranych w odstępie 2 tygodni z tych samych roślin porażonych wirusem. W doświadczeniu tym, metodą SC-RT-PCR wykryto wirusa nawet w rozcieńczonych 4096 razy ekstraktach z symptomatycznych roślin oraz w dwóch z trzech próbek pobranych z roślin, na których nie rozwinęły się jeszcze symptomy chorobowe. W równoległe przeprowadzonym teście ELISA (odczynniki firmy Loewe), wynik pozytywny uzyskano tylko dla próbek

o najwyższym stężeniu wirusa (ekstrakty z symptomatycznych roślin bez rozcieńczenia). Wskazuje to na konieczność szczegółowego określenia metodyki pobierania próbek do testu ELISA oraz interpretacji wyników.

Odczytano pełną sekwencję genu (a właściwie cistronu) białka płaszcza jednego z izolatów TuMV. Analiza odczytanej sekwencji wykazała jej bardzo duże podobieństwo do izolatu CAR51 znalezione w Polsce kilkanaście lat temu i nie przyniosła wskazówek w kwestii wyjaśnienia bardzo małej skuteczności jednego z zestawów przeciwciał.

Opracowane metody mikrorozmnażania oraz będąca jeszcze w trakcie optymalizacji metoda uwalniania od wirusów chrzanu i rabarbaru będą przydatne zarówno producentom jak i hodowcom.