

OPRACOWANIE TECHNOLOGII PRODUKCJI ODWIRUSOWANYCH SADZONEK WARZYW Z ZASTOSOWANIEM KULTUR TKANEK

Autorzy:

prof. dr hab. Krystyna Górecka

mgr inż. Agata Kapuścińska

mgr inż. Maria Burian

mgr inż. Urszula Kowalska

dr Waldemar Kiszczak

mgr inż. Lidia Fornal

dr Tadeusz Malinowski

Grażyna Szczechowicz

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.17:**

"Opracowanie technologii produkcji odwirusowanych sadzonek warzyw z zastosowaniem kultur tkanek"

Programu Wieloletniego:

„Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów” finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2014

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Opracowanie metody intensywnego mnożenia *in vitro* badanych roślin
4. Wykrywanie wirusów w roślinach chrzanu i rabarbaru, a następnie w roślinach wyprowadzonych w kulturach tkanek z roślin porażonych wirusem TuMV w celu stwierdzenia czy w kulturach *in vitro* uwolnione zostały od tego wirusa.
5. Podsumowanie i wnioski

1. Wstęp

Choroby wirusowe stanowią poważny problem ze względu na straty w plonach ważnych gospodarczo warzyw, w tym przypadku chrzanu oraz rabarbaru. Najważniejszym wirusem atakującym uprawy chrzanu jest wirus mozaiki rzepy Turnip mosaic virus (TuMV). Rośliny porażone tym wirusem charakteryzują się mniejszym przyrostem oraz występowaniem widocznych symptomów w postaci chlorotycznych pierścieni na powierzchni blaszki liściowej. Porażenie sadzonek chrzanu tym wirusem powoduje znaczne obniżenie plonu, sięgające nawet 40%. Opracowanie metody uzyskiwania zdrowego materiału wyjściowego ważnych gospodarczo warzyw pozwoli znacznie podwyższyć ich plon oraz jakość. Przy użyciu kultur merystemów możliwe jest otrzymanie zdrowych roślin z materiału wyjściowego porażonego patogenem.

Uprawa roślin zdrowych pozwoli ograniczyć stosowanie środków ochrony roślin, a tym samym znacznie poprawi efektywność produkcji tzw. żywności ekologicznej, i jej konkurencyjność na rynku. Uwzględniając w/w zagrożenia, podstawowym celem zadania było opracowanie technologii produkcji odwirusowanych sadzonek warzyw z zastosowaniem kultur tkanek.

2. Cel zadania

Celem niniejszego zadania jest wykorzystanie kultur tkanek do odwirusowywania i intensywnego namnażania zdrowego materiału roślinnego.

Badania prowadzono dwutorowo:

1. Opracowywano metodę intensywnego mnożenia *in vitro* badanych roślin
2. Wykrywano wirusy w roślinach chrzanu i rabarbaru, a następnie w roślinach wyprowadzonych w kulturach tkanek z roślin porażonych wirusem TuMV w celu stwierdzenia czy w kulturach *in vitro* uwolnione zostały od tego wirusa.

3. Opracowanie metody intensywnego mnożenia *in vitro* badanych roślin

Chrzan i rabarbar są bardzo trudnymi obiektami jak chodzi o zakładanie kultur inicjalnych merystemów, ponieważ pąki pobiera się z części podziemnych karp w przypadku rabarbaru i korzeni chrzanu. Prowadzono doświadczenia z użyciem różnych środków wyjaławiania. Były to - alkohol etylowy, chloramina T, podchloryn wapnia, chlorek rtęci używano ich w różnych stężeniach, traktowano nimi eksplantaty przez różne okresy czasu. Stosowano metody łączone, gdzie jeden środek używano następnie po drugim.

Dla rabarbaru stosowano 3 sposoby wyjaławiania:

1. Płukanie pąków 24 godz. pod bieżącą wodą, traktowanie 70% etanolem przez 2 min. i 5% podchlorynem wapnia z 0,1% Tweenem 20 przez 20 min.

2. Płukanie pąków 24 godz. pod bieżącą wodą, traktowanie 70% etanolem przez 2 min i 3% podchlorynem wapnia z 0,1% Tweenem 20 przez 20 min.
3. Płukanie pąków 5 min. 1% roztworem wodnym Tweenu 20, traktowanie 70% etanolem przez 0,5 min i 0,1% chlorkiem rtęci przez 1 min.

Dla pąków chrzanu stosowano:

1. 24 godzinne płukanie pąków pod bieżącą wodą, traktowanie 80% etanolem przez 6 minut, 10% roztworem chloraminy T przez 10 minut.
2. 24 godzinne płukanie pąków pod bieżącą wodą a następnie umieszczenie w 1% Tweenie 20 na 5 min, traktowanie 70% etanolem przez 30 sek., 0,1% chlorkiem rtęci przez 1 min.

W każdym z zastosowanych sposobów materiał roślinny przepłukiwano 10 krotnie w sterylnej wodzie destylowanej.

Badano też wstępne traktowanie korzeni i karp przed pobieraniem pąków. Po wyjęciu z chłodni dokładnie opłukano je pod bieżącą wodą, a następnie część z nich zanurzono w 0,5% roztworze chloraminy T na 30 min, część natomiast w 0,3% roztworze miedzianu WG na 15 minut. Korzenie i karpy przysypywano piaskiem z dodatkiem torfu. Po 7 dniach pobrano pączki i wysterylizowano je jednym z dwóch sposobów.

W większości sposobów wyjaławiania procent zakażonych kultur był wysoki. Najwięcej eksplantatów czystych w przypadku rabarbaru stwierdzono przy wyjaławianiu 3 sposobem, z zastosowaniem HgCl_2 . Uzyskano 65,4% eksplantatów czystych. Wyjaławianie podchlorynem wapnia okazało się mniej efektywne, pośród eksplantatów wyjaławianych sposobami 1 i 2 obserwowano więcej niż 50% zakażeń. Materiał wyjściowy do zakładania kultur merystemów chrzanu okazał się jeszcze trudniejszy do wyjaławiania. Najbardziej skuteczny okazał się pierwszy sposób sterylizacji, czyli 24-godzinne płukanie pąków pod bieżącą wodą, a następnie traktowanie ich 80% alkoholem przez 6 minut i 10% roztworem chloraminy T przez 10 minut. Kultury czyste stanowiły 40%. Drugi sposób wyjaławiania dał gorsze rezultaty. Czyste eksplantaty stanowiły 28%. W przypadku rabarbaru, przy zastosowaniu sposobu, który w poprzednim roku okazał się najlepszy, wystąpiły w następnym roku badań liczne zakażenia. Jest to znany fakt, że tak trudny do sterylizacji materiał jak fragmenty roślin pobrane z części podziemnych, może w różnych partiach materiału roślin albo w różnych okresach sprawiać kłopoty z osiągnięciem sterylności, ponieważ mogą go zasiedlać różne mikroorganizmy w różnych okresach czasu i ich liczebność może też się znacznie różnić. Również zastosowanie sposobów wstępnego traktowania karp rabarbaru oraz korzeni chrzanu chloraminą T lub miedzianem nie dało dobrych rezultatów. Wciąż obserwowano wysoki procent zakażeń.

Następnie do powierzchniowej sterylizacji pąków chrzanu i rabarbaru użyto preparatu PPM (Plant Preservative Mixture). Po 24 godzinnym płukaniu pod bieżącą wodą pąki traktowano 5% (v/v) roztworem PPM na wytrząsarce przez 4 godziny. Ten sposób sterylizacji okazał się najbardziej efektywny dla tak trudnych obiektów jak pąki rabarbaru czy chrzanu. Uzyskano wysoki procent kultur czystych, który wynosił 95% dla rabarbaru i 78% dla chrzanu (są to średnie z dwóch lat). PPM nie uszkadzał też traktowanych nim eksplantatów co jest również bardzo ważne. Stwierdzono, że pąki chrzanu są obiektem trudniejszym do wyjaławiania. Wystąpiły różnice między badanymi gatunkami pod względem liczby merystemów, które podejmowały rozwój. Było ich więcej w przypadku chrzanu.

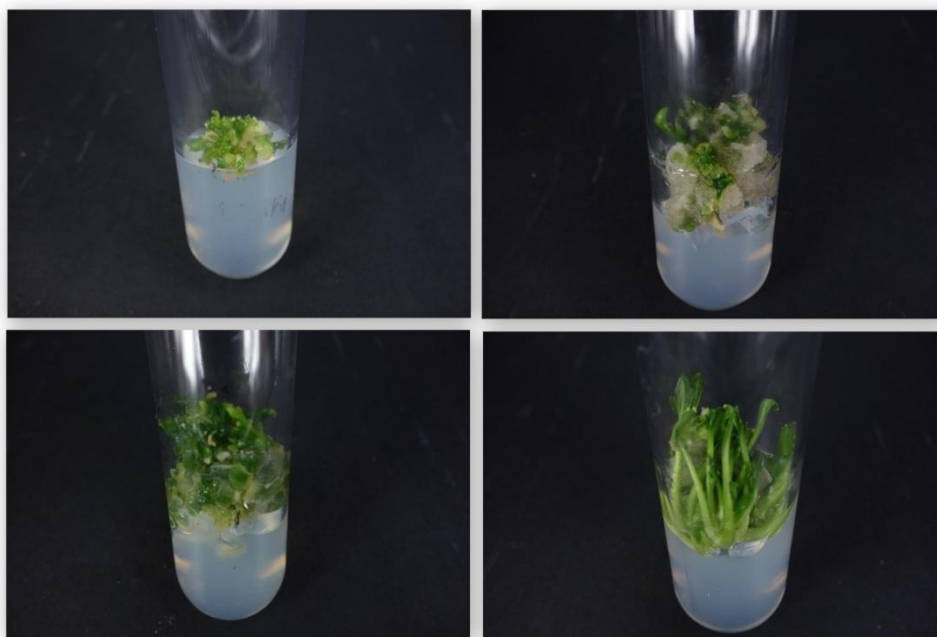
Z wysterylizowanych pąków w jałowych warunkach wypreparowywano merystemy. Merystemy chrzanu lepiej rozwijały się na pożywce MS (Murashige i Skoog) z dodatkiem 0,2 mg/l Kin, 1 mg/l IAA oraz 0,1% (v/v) PPM. Natomiast w przypadku merystemów rabarbaru większe namnożenie zaobserwowano na pożywce MS wzbogaconej 2 mg/l BA, 1 mg/l IBA

i 0,1% (v/v) PPM. U obu gatunków na lepszej pożywce procent uzyskanego namnożenia wynosił 50.

Badano zdolności do regeneracji różnych eksplantatów. Były to rozetki (skrócone pędy), liście a nawet ich fragmenty. Przeprowadzono szereg doświadczeń z różnymi eksplantatami i wieloma pożywkami, aby dla każdego z eksplantatów dobrać najbardziej odpowiednią pożywkę, która dawałaby największe namnożenie. Stosowano różne cytokininy :Kin, BA, 2iP, TDZ w różnych stężeniach i w połączeniu z różnymi auksynami oraz z dodatkiem poliaminy –putrescyny. W przypadku obu gatunków większe zdolności regeneracyjne wykazywały rozety.

Dla rozet chrzanu najintensywniejsze namnożenie uzyskano stosując pożywkę MS z dodatkiem 2iP, szczególnie w stężeniu 30mg/l w połączeniu z 0,01 mg/l IAA, 23,6 zaczątków nowej rozety i 5,8 rozet nieukorzenionych.

Natomiast dla liści a nawet ich fragmentów najlepsze okazały się pożywki z dodatkiem TDZ. Na pożywce z 1 mg/l lub 5 mg/l TDZ w połączeniu z 1 mg/l NAA na wyłożonych liściach a nawet ich fragmentach wytworzyły się zgrupowania zawiązków pędów. Na pożywce z 5 mg/l TDZ i 1 mg/l NAA proces ten był intensywniejszy. Pędów i zawiązków było często tak wiele, że pokrywały całą powierzchnię liścia czy jego fragmentu a nawet pożywki (fot.1). Po podzieleniu otrzymanych skupisk zaczątków i przepasażowaniu ich na te same pożywki następowało dalsze ich namnażanie. Przy niższym stężeniu TDZ, czyli na pożywce z 1 mg/l TDZ i 1 mg/l NAA z grup utworzonych zaczątków pędów powstawały już rozetki.



Fot.1 Przykłady namnożenia z fragmentów liści chrzanu na pożywce MS z dodatkiem 5 mg/l TDZ i 1mg/l NAA

Zdolności regeneracyjne rozet i liści rabarbaru były niższe niż w przypadku chrzanu. Dla rozet rabarbaru najlepsze były pożywki MS z 30 mg/l 2iP i 0,01 mg/l IAA oraz 5 mg/l BA i 1 mg/l IBA. Dla liści najlepsze były pożywki, podobnie jak w przypadku chrzanu najlepsza była pożywka MS z dodatkiem 5 mg/l TDZ i 1 mg/l NAA oraz z 2 mg/l BA i 1 mg/l IBA.

W doświadczeniach nad ukorzenianiem otrzymanych rozet zastosowano pożywki MS z obniżoną do połowy zawartością makroelementów, obniżoną koncentracją sacharozy oraz z auksynami NAA i IBA stosowanymi łącznie lub oddzielnie i z dodatkiem putrescyny. Wszystkie zastosowane pożywki ukorzeniające pozwoliły na uzyskanie wysokiego procentu roślin ukorzenionych. Najlepszą dla obu gatunków okazała się pożywka MS zawierająca połowę stężenia makroelementów, 20 g/l sacharozy oraz 3 mg/l NAA. Rozety chrzanu ukorzeniały się na

niej w 80% a rabarbaru w 100%. Jak widać rozety rabarbaru ukorzeniały się łatwiej niż rozety chrzanu.

Etap ukorzeniań udało się uprościć i spowodować obniżenie kosztów poprzez przeprowadzenie tego procesu *ex vitro*. Otrzymane *in vitro* rozety ukorzeniano w podłożach będących mieszaniną piasku i torfu w mikropaletach umieszczonych na macie podsiąkowej w namiocie foliowym zapewniającym 100% wilgotność. Rozety traktowano roztworem IBA w stężeniu 5 mg/l przez 5 sekund, a następnie umieszczano w podłożu. Dla obu gatunków lepsze okazało się podłoże składające się z 3 części piasku i 1 części torfu. Również *ex vitro* rozety rabarbaru ukorzeniały się lepiej- uzyskano 100% ukorzenionych roślin.

Prawidłowo rozwinięte rośliny chrzanu i rabarbaru uzyskane w kulturach *in vitro* były poddawane procesowi adaptacji poprzez wysadzenie do podłoża i umieszczenie w warunkach 100% wilgotności. Rośliny oby badanych gatunków z łatwością adaptowały się do warunków świata zewnętrznego. Wyższy procent zaadaptowanych roślin uzyskano dla roślin rabarbaru i chrzanu w podłożu będącym mieszaniną piasku i ziemi ogrodniczej w stosunku 1:3.

Opracowaną metodę wykorzystano do zakładania i prowadzenia kultur *in vitro* chrzanu i rabarbaru z roślin porażonych wirusem TuMV. Otrzymane rośliny poddano testom na obecność tego wirusa. Stwierdzono, że otrzymano rośliny chrzanu i rabarbaru wolne od wirusa TuMV.

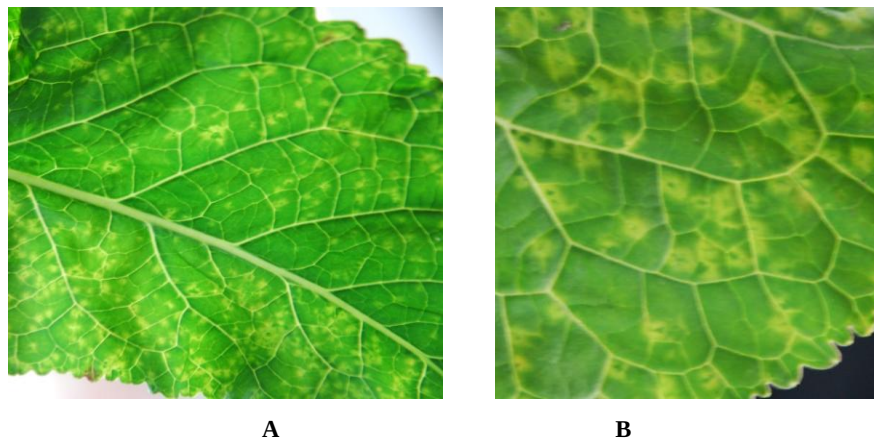
4. Wykrywanie wirusów w roślinach chrzanu i rabarbaru, a następnie w roślinach wyprowadzonych w kulturach tkanek z roślin porażonych wirusem TuMV w celu stwierdzenia czy w kulturach *in vitro* uwolnione zostały od tego wirusa

Badaniami objęto następujące wirusy:

- a) wirus mozaiki rzepy (*Turnip mosaic virus*, TuMV)
- b) wirus mozaiki gęsiówki (*Arabis mosaic virus*, ArMV)
- c) wirus mozaiki kalafiora (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)
- d) wirus czarnej plamistości pierścieniowej pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV)
- e) wirus mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic virus*, CMV).

Stosując sekwencjonowanie drugiej generacji na platformie Illumina z wykorzystaniem bibliotek cDNA przygotowanych dla frakcji polyA RNA i sRNA, stwierdzono w wybranych roślinach chrzanu obecność wirusa mozaiki rzepy (TuMV) (fot. 2) oraz wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV). Zastosowana metoda umożliwiała wykrycie praktycznie wszystkich wirusów (w tym planowanych pięciu). Nie stwierdzono obecności innych wirusów. Odczytano pełne sekwencje genomów wykrytych wirusów. Analiza BLAST pełnej sekwencji izolatu TuMV-TM6 potwierdziła jego bardzo wysokie podobieństwo (>98.86% identycznych nukleotydów, 0 różnic ins/del) do izolatu TuMV-CAR51 (Pyrski i Lehmann; GenBank # HQ637383).

Obserwowane symptomy porażenia zilustrowano na fotografiach poniżej.

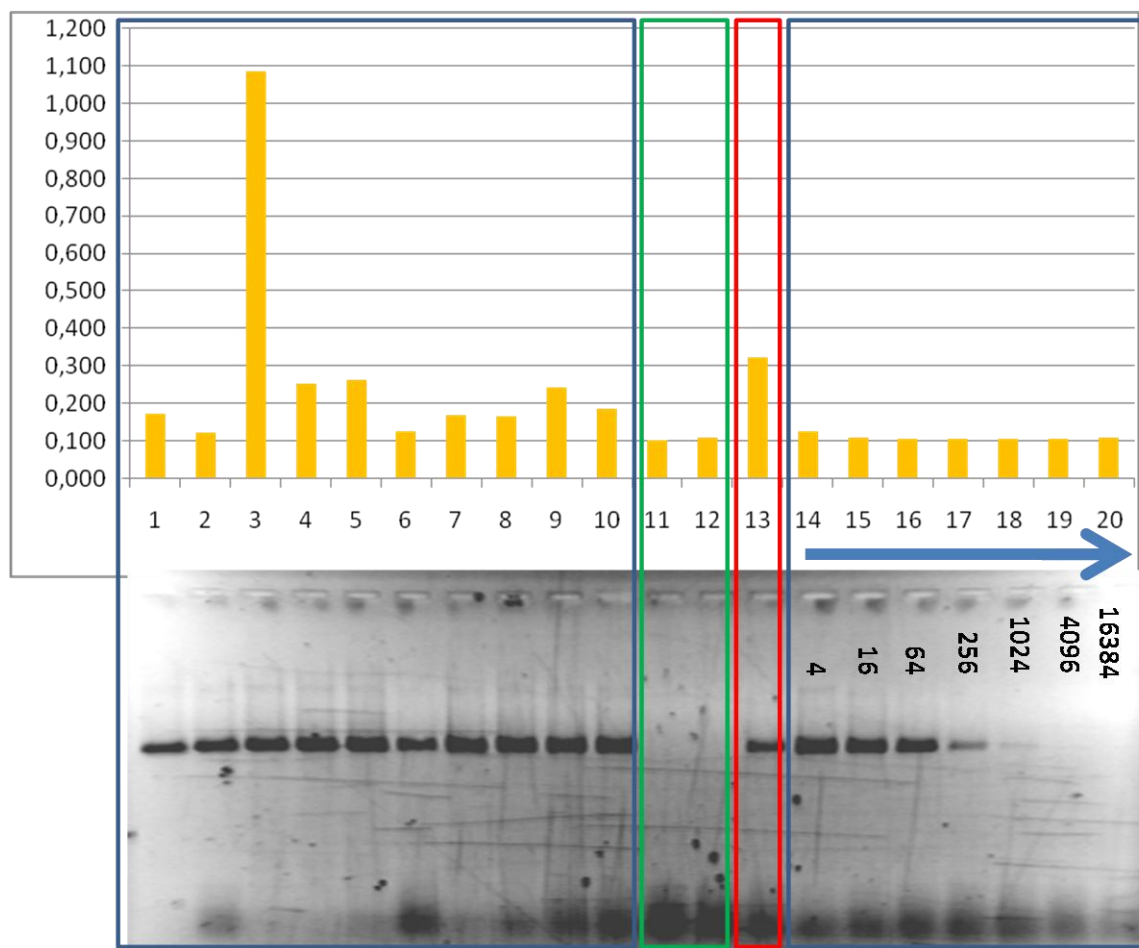


Fot.2. Symptomy porażenia wirusem mozaiki rzepy (TuMV) na liściach roślin chrzanu

Na zdjęciu z lewej (A) zilustrowano niejednorodne natężenie symptomów chorobowych oraz słabszy przyrost blaszki liściowej na tej połowie liścia, na której występuje większe nasilenie symptomów (i prawdopodobnie większe średnie stężenie cząstek wirusa w tkance liściowej). Na zdjęciu z prawej (B) pokazano powiększenie wybranego fragmentu liścia z rozwiniętymi symptomami w kształcie rozmytych, chlorotycznych pierścieni.

Ze względu na stwierdzenie w roślinach chrzanu obecności wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV), od roku 2014 testy metodą ELISA prowadzono na obecność sześciu wirusów: TuMV, TBRV, ArMV, CaMV, TRSV oraz CMV. Celowość tego uzupełnienia potwierdziły wyniki badania roślin chrzanu (TBRV wykryto w >50% badanych roślin).

W listopadzie 2013, kwietniu, maju (rys.1) i sierpniu 2014 wykonano doświadczenia, w których porównano wyniki testów ELISA oraz RT-PCR na obecność TuMV w roślinach chrzanu (uzyskanych z rozmnożenia pojedynczej, porażonej wirusem rośliny i rosnących w doniczkach w szklarni) oraz w próbkach przygotowanych przez rozcieńczenie (w różnych proporcjach - szereg rozcieńczeń) ekstraktów z rośliny porażonej w ekstraktach z roślin zdrowych. Wyniki jednoznacznie wskazały na bardzo dużą przewagę metody RT-PCR, szczególnie wiosną, kiedy metodą ELISA uzyskiwano negatywne lub niejednoznaczne wyniki nawet z roślin wykazujących charakterystyczne symptomy porażenia TuMV. Dla wszystkich symptomatycznych roślin oraz części roślin bez symptomów chorobowych test oparty na wykorzystaniu RT-PCR dawał wynik pozytywny. Tylko w jednym przypadku, w sierpniu 2014, uzyskano dla rośliny nr 5 wynik pozytywny w teście ELISA a negatywny w teście opartym na RT-PCR. Na podstawie porównania wyników badania próbek tworzących szeregi rozcieńczeń stwierdzono, że RT-PCR umożliwiał wykrycie TuMV z czułością od 4 do 1024 razy wyższą niż uzyskiwana w metodzie ELISA. Poniżej przedstawiono wyniki eksperymentów z maja i sierpnia 2014.



Rys. 1. Wykrywanie TuMV w liściach chrzanu metodami ELISA i RT-PCR (maj 2014)

Trzydzieści linii kultur *in vitro* założonych z merystemów pobranych z roślin chrzanu porażonych wirusami TuMV i TBRV przebadano testem ELISA na obecność obu wirusów oraz testem SC-RT-PCR (silicacapture – reverse transcription – polymerase chain reaction) na obecność TuMV. We wszystkich zbadanych roślinach wykryto obecność TBRV. Dla sześciu linii: 282, 339, 348, 356, 417, 421, uzyskano dwukrotnie negatywny wynik obu testów (ELISA i SC-RT-PCR) na obecność TuMV. Dla linii 261, 343 i 423 uzyskano negatywny wynik testu ELISA i niejednoznaczny wynik jednego z dwóch testów SC-RT-PCR. Jeśli wyniki te zostaną potwierdzone w kolejnych testach po ukorzenieniu roślin oznacza to, że metodą zakładania kultur merystematycznych (bez dodatkowych terapii) uzyskano rośliny chrzanu uwolnione od wirusa TuMV. Niestety, metoda ta nie była skuteczna w stosunku do wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV). Poniżej przedstawiono wyniki testu SC-RT-PCR 23 próbek pobranych z roślin chrzanu *in vitro* (oraz kontroli) na obecność TuMV (Fig.3).

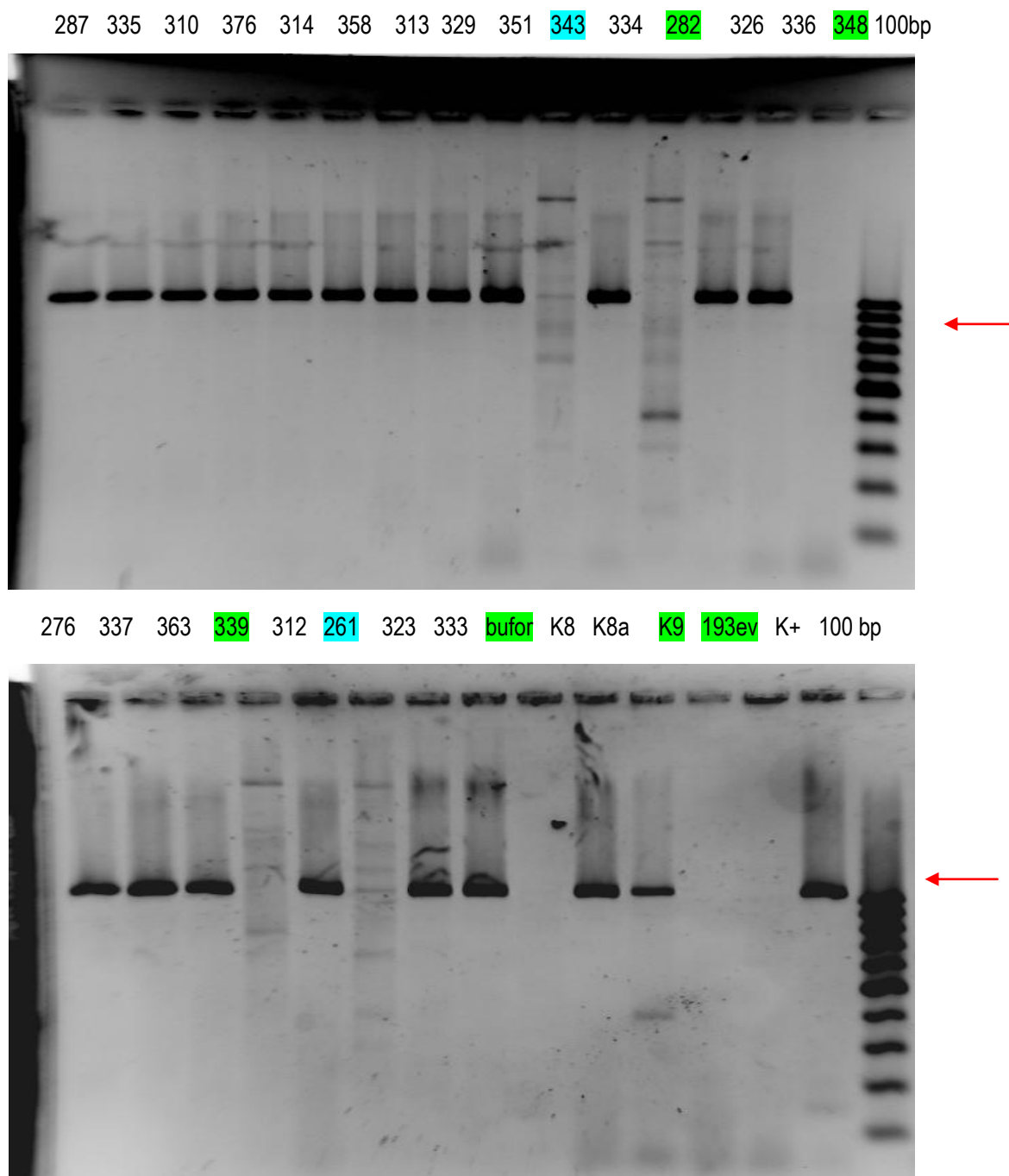


Fig.3 Wyniki testu SC-RT-PCR na obecność TuMV w roślinach chrzanu *in vitro*

Pobrano 129 próbek liści lub całych roślin z trzech plantacji w województwie łódzkim, z okolic Opoczna. Próbki te przebadano testem ELISA na obecność: TuMV, TBRV, ArMV, CaMV, TRSV i CMV. Dodatkowo wszystkie próbki przebadano też metodą IC-RT-PCR na obecność TuMV. Obecność CaMV w roślinach chrzanu stwierdzono w Polsce po raz pierwszy. Dlatego kilka wybranych roślin, w których metodą ELISA wykryto ArMV i/lub CaMV dodatkowo przebadano metodą –PC-RT-PCR i potwierdzono obecność wirusów.

Podsumowanie przeprowadzonych testów materiału wyjściowego przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 1. Wyniki testów ELISA na obecność sześciu wirusów w roślinach chrzanu pobranych bezpośrednio z plantacji w województwie łódzkim

Miejsce – typ/'odmiana'	TuMV	TBRV	ArMV	CaMV	TRSV	CMV
S – Staropolski	9/ 34	12/ 34	9/ 34	10/ 34	0/ 34	0/ 34
O - Staropolski	29/ 67	51/ 67	30/ 67	58/ 67	0/ 60	0/ 60
K - Duńczyk	15/ 28	6/ 28	28/ 28	0/ 28	0/ 28	0/ 28
RAZEM:	53/129	69/129	67/129	68/129	0/129	0/129

Metodą ELISA przebadano 34 roślin rabarbaru na obecność pięciu wirusów. Dodatkowo, obecność TuMV sprawdzono metodą SC-RT-PCR. W trzech roślinach: "R1", "27,1" i r15 stwierdzono obecność wirusa metodą SC-RT-PCR. R1 została wykorzystana do założenia kultur *in vitro* i opracowania metodyki uwalniania od TuMV. W dwóch roślinach (r8 i r15) stwierdzono metodą ELISA obecność TBRV (tab. 2).

Tabela 2. Wyniki testu roślin rabarbaru na obecność pięciu wirusów

Miejsce pobrania prób	TuMV	TBRV	ArMV	TRSV	CMV
Szklarnia	2/11	0/11	0/11	0/11	0/11
Pole doświadczalne	1/23	2/23	0/23	0/23	0/23
RAZEM:	3/34	2/34	0/34	0/34	0/34

Założono kultury *in vitro* z merystemów pobranych z roślin rabarbaru porażonych wirusami TuMV (R1) lub TuMV i TBRV (r15). Rośliny te były następnie badane na obecność TuMV i TBRV metodą ELISA i dodatkowo metodą SC-RT-PCR na obecność TuMV. Z rośliny R1 uzyskano trzy linie kultur *in vitro* rabarbaru (507, 508, 511) uwolnione od wirusa TuMV.

5. Podsumowanie i wnioski

- Opracowano metodę mikrorozmnażania roślin rabarbaru i chrzanu.
 - Znaleziono efektywny sposób sterylizacji bardzo trudnych eksplantatów inicjalnych jakimi są pąki pobrane z części podziemnych, a więc korzeni czy karp podziemnych.
 - Stwierdzono bardzo dużą zdolność do proliferacji różnych eksplantatów chrzanu: merystemów, rozetek, liści, a nawet ich fragmentów
 - Dla każdego eksplantatu chrzanu czy rabarbaru dobrano pożywki dające najlepszy współczynnik namnażania.
 - Uproszczono ukorzenianie poprzez opracowanie sposobu prowadzenia tego procesu *ex vitro*.
- W badanych roślinach chrzanu i rabarbaru stwierdzono testem ELISA obecność wirusów: Turnip mosaic virus (TuMV), Tomato black ring virus (TBRV), Arabis mosaic virus (ArMV), oraz Cauliflower mosaic virus (CaMV). Obecność CaMV w roślinach chrzanu stwierdzono w Polsce po raz pierwszy.
- Obecność TuMV, ArMV i CaMV w wybranych roślinach potwierdzono dodatkowo testem RT-PCR. Ze względu na stosunkowo wysoki procent porażenia, częste występowanie

infekcji mieszanych oraz zaobserwowane symptomy chorobowe stwierdzono wstępnie celowość weryfikacji wcześniejszych ocen o niskim stopniu szkodliwości wirusów innych niż TuMV w produkcji chrzanu.

4. Metodą sekwencjonowania NGS odczytano pełne genomy izolatów TuMV oraz TBRV (RNA1, RNA2 i satRNA).
5. Stwierdzono bardzo ograniczoną (wbrew wcześniej publikowanym doniesieniom) przydatność metody ELISA do wykrywania TuMV w liściach chrzanu. Metodą SC-RT-PCR wykrywano wirusa w roślinach nawet kilka tygodni przed pojawieniem się symptomów. Przeprowadzone badania pozwoliły na znaczne zwiększenie wiarygodności testów na obecność TuMV.
6. Uzyskano rośliny chrzanu i rabarbaru uwolnione od TuMV z kultur *in vitro* zakładanych z roślin porażonych tym wirusem. Pozwoli to na w przyszłości na zaoferowanie zdrowych sadzonek tych roślin.