

Zadanie 1.17: Opracowanie technologii produkcji odwirusowanych sadzonek warzyw z zastosowaniem kultur tkanek
Kierownik zadania: prof. dr hab. K. Górecka

Do badań w ramach tematu wytypowano chrzan jako drugą roślinę, u której prawie 100% sadzonek jest porażonych wirusem mozaiki rzepy (TuMV- Turnip Mosaic Virus). Przebadano sposoby wyjąławiania pąków wyrastających na korzeniach chrzanu i karpach rabarbaru, które są materiałem wyjściowym do zakładania kultur tkanek. Próbowano też sposoby wstępnego traktowania korzeni i karp przed pobieraniem pąków. Po wyjęciu z chłodni dokładnie oplukano je pod bieżącą wodą, część z nich zanurzono w 0,5% roztworze chloraminy T na 30 minut, lub w 0,3% roztworze Miedzianu WG na 15 minut. Po 7 dniach pobrano pączki i wysterylizowano je jednym z dwóch sposobów. Wysterylizowane pąki były źródłem merystemów, które wypreparowano w warunkach sterylnych po mikroskopem stereoskopowym.

Do regeneracji zastosowano 7 pożywek na bazie MS (Muraschige i Skoog 1962). Po ok. 2 tygodniach sprawdzono sterylność założonego doświadczenia, a po ok. 7 tygodniach wykonano pierwszy pasaż.

W przypadku sterylizacji chrzanu najbardziej skuteczne okazało się 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%.

Spośród zastosowanych pożywek, merystemy chrzanu najlepiej rozwijały się na pożywce MS 0,2 mg kinetyny i 1 mg IAA. Na pożywce MS z 2 mg T Diazuronu i 1 mg NAA uzyskano 35% rozwijających się eksplantatów.

Z karp rabarbaru przechowywanej w torfie, w chłodni, pobrano pąki i wysterylizowano sposobem uznanym za najlepszy, w poprzedniej fazie badań (24 godziny płukania pod bieżącą wodą, 5 min 1% Tween 20, 30 sek. 70% alkohol, 1 min 0,1% HgCl₂, 10 x płukanie sterylną wodą destylowaną). Z pąków, w warunkach sterylnych, wypreparowywano merystemy i przełożono na siedem pożywek, takich jak użyto dla chrzanu. Najwięcej merystemów podjęło rozwój na pożywkach z T Diazuronem w stężeniach 2 mg/l i 5 mg/l w połączeniu z 1 mg NAA. Także w pożywce MS z 2iP w stężeniu 20 mg/l i 0,01 mg IAA 33,3% merystemów rozwinęło się. Pożywka z 2 mg/l T Diazuronu i 1 mg NAA okazała się najlepsza dla rabarbaru, ale i w przypadku chrzanu uzyskano na niej dobry rezultat. Porównując oba badane gatunki zaobserwowano wyższą zdolność regeneracyjną u chrzanu.

Materiał Roślinny uzyskany *in vitro* po pasażu chrzanu poddano testowi na obecność wirusów. Zastosowano test DAS-ELISA, dzięki któremu wykryto obecność pięciu następujących wirusów: CLRC ch – wirus liściozwoju wiśni ze szczepu wiśni, CLRV e – wirus liściozwoju wiśni ze szczepu bzu czarnego, AMV-A – wirus mozaiki lucerny, CMV – wirus mozaiki ogórka i TuMV – wirus mozaiki rzepy. Przygotowano kontrolę negatywną i pozytywną. W wyniku przeprowadzonej procedury zaczęto obserwować reakcję barwną, zmierzono absorbancję przy długości fali 405 nm.

Otrzymane wyniki pomiaru absorbancji prób nie wykazały obecności żadnego z badanych wirusów, zarówno w materiale wyjściowym (roślinie donorowe), jak i w materiale z kultur *in vitro*.