

ZWALCZANIE ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH W KULTURACH IN VITRO ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ PREPARATÓW PPM I PROCLIN

COMBATING BACTERIAL INFECTIONS IN *IN VITRO* POTATO CULTURES USING THE PPM AND PROCLIN PREPARATIONS

mgr inż. Dorota Michałowska, inż. Danuta Sekrecka
dr inż. Agnieszka Przewodowska, mgr inż. Joanna Piskorz
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl

Streszczenie

Bakterie endogenne stanowią problem dla kultur *in vitro* niezależnie od gatunku rośliny. Odkazanie pożywek, naczyń laboratoryjnych oraz praca z zachowaniem rygorów sterylności powinny teoretycznie umożliwić otrzymanie sterylnych kultur tkankowych. Jednak po kilku lub kilkunastu pasażach u części kultur *in vitro* widoczne są zanieczyszczenia bakteryjne. Na rynku pojawiło się wiele preparatów bakteriobójczych, jak: Plant Preservation Mixture (PPM), Vitrofur, ProClin, Decaben C. Dlatego podjęto prace nad ustaleniem stężeń wybranych preparatów w odniesieniu do roślin ziemniaka w hodowli *in vitro*.

Słowa kluczowe: bakterie endogenne, biocydy, *in vitro*, preparaty bakteriobójcze, ziemniak

Abstract

Endogenous bacteria are a problem for *in vitro* cultures, regardless of the plant species. Disinfection of nutrient media, laboratory vessels and work with the rigors of sterility should theoretically enable to obtain sterile tissue cultures. However, after several passages, bacterial contaminants are still visible in some *in vitro* cultures. Many bactericidal preparations appeared on the market, such as: Plant Preservation Mixture (PPM), Vitrofur, ProClin, Decaben C. Therefore, work was undertaken to determine the concentrations of selected preparations in relation to potato plants cultured *in vitro*.

Keywords: bactericidal preparations, biocides, endogenous bacteria, *in vitro*, potato

Zjawisko występowania populacji bakterii towarzyszących roślinom wskazuje na to, że zdrowe rośliny zawierają zespoły tzw. bakterii endofitycznych. Mogą one wpływać na rośliny w różny sposób: hamować ich rozwój, stymulować lub pozostawać obojętnymi w stosunku do organizmu gospodarza. Po raz pierwszy endofity zostały zdefiniowane przez Wilsona (1995) jako mikroorganizmy żyjące wewnątrz rośliny. Z kolei Strobel (2004) dodał, że endofit (ang. endophyte) oznacza dosłownie „wewnątrz rośliny” i każda roślina jest gospodarzem dla kilku gatunków bakterii i grzybów, jednak na ogół jeden lub dwa są dominujące. Zanieczyszczenia bakteryjne są dużym problemem w rozmnażaniu *in vitro* wszystkich gatunków roślin, w tym i ziemniaka. Szczególnie ważne jest to w kulturach wieloletnich,

które stanowią podstawę w bankach genów *in vitro*.

Źródła zanieczyszczeń kultur *in vitro* zazwyczaj są trudne do określenia. Bakterie, które zanieczyszczają kultury, mogą pochodzić z eksplantatu, środowiska laboratoryjnego, być przeniesione przez roztocze, wciornastki i przędziorki lub na skutek niedokładnej sterylizacji podłoża, jak i pola pracy. Właściwie na każdym etapie mikrorozmnażania może dojść do zanieczyszczenia hodowli *in vitro*.

W kulturach tkankowych bakterie endogenne są najczęściej wnoszone z eksplantatem inicjalnym. Już 3-5. dnia po wszczęciu eksplantatów na pożywkę w niektórych kulturach u ich podstawy obserwuje się nieznaczne zmętnienie podłoża tworzące „halo”. Kontrola wzrokowa pożywki oraz wszczepionych fragmentów roślin może tylko

w części wychwycić niektóre zanieczyszczenia. Dezynfekcja eksplantatów umożliwia usunięcie bakterii jedynie z ich powierzchni. Całkowite odkażenie wewnętrznych tkanek jest niemożliwe z powodu fitotoksyczności środków odkażających. Izolować należy więc jak najmniejsze eksplantaty, np. merystemy, aby uniknąć wprowadzenia bakterii do kultur *in vitro*. Teoretycznie bakterie te nie są szkodliwe dla mierzonych roślin, część reaguje nawet na nie pozytywnie, jednak ich obecność w kulturach roślinnych jest niepożądana. Zdarza się, że obecność bakterii wywołuje zmiany w podłożu agarowym, co może mieć negatywny wpływ na proces namnażania, m.in. na mikrotuberyzację roślin ziemniaka.

W hodowlach *in vitro* bakterie endogenne często występują w stanie utajonym w eksplantatach, powoli się namnażają i mogą ujawnić się dopiero po kilku lub kilkunastu pasażach. Z tego względu tak ważne jest ograniczenie populacji tych bakterii, m.in. przez bezwzględne eliminowanie kultur zasiedlonych bakteriami patogenicznymi, częste zakładanie nowych kultur oraz stosowanie bakteriocydów i bakteriostatyków. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych lub bakteriostatycznych musi być jednak bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego konieczne jest eksperymentalne ustalenie stężenia preparatu w odniesieniu do poszczególnych gatunków roślin. Na rynku dostępne są różne preparaty bakteriobójcze, m.in. PPM, ProClin, Nitrofurazone, Biosept33Sl, azotan srebra, podchloryn sodu, liczne antybiotyki i olejki eteryczne. W Pracowni Zasobów Genowych i Kultur *in vitro* w Boninie przetestowano dwa preparaty bakteriobójcze: PPM i ProClin.

Plant Preservative Mixture to biocyd o szerokim spektrum działania, polecany w hodowli tkanek roślinnych do powszechnego stosowania. Wykorzystywany jest przeciw bakteriom i grzybom rosnącym na pożywce, a także w zanieczyszczonych tkankach. W zależności od dawki i stopnia zakażenia może pełnić funkcję składnika biostatycznego, jak również środka zapobiegawczego. PPM został przetestowany na wielu gatunkach roślin, m.in. na cytrusowych, kapustnych, melonie, petunii, tytoniu (Compton, Koch 2001).

Z kolei ProClin to biocyd oraz konserwant do odczynników stosowanych w diagnostyce *in vitro*. Przedstawiany jest jako wysoce efektywny środek z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności i niskiej toksyczności. ProClin został wybrany do doświadczenia, gdyż w badaniach na eksplantatach gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty nie był toksyczny. W stosunku do roślin ziemniaka w zastosowanych dawkach okazał się jednak bardzo fitotoksyczny.

Oba środki są stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych roślin, nie ma natomiast informacji na temat ich wykorzystania w kulturach *in vitro* ziemniaka.

Materiał i metody

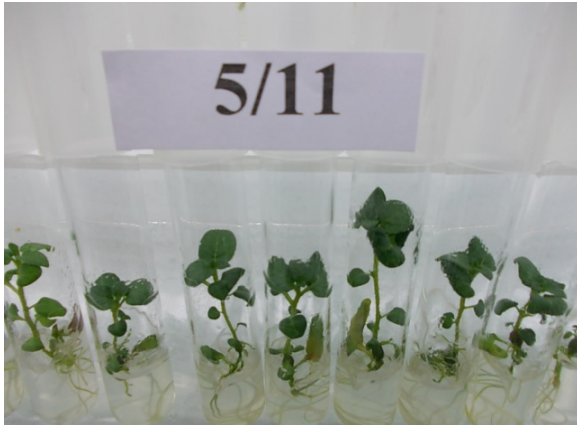
Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* czterech odmian ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Rośliny pozyskane z banku genów *in vitro* były 3-krotnie pasażowane w celu osiągnięcia pożądanej liczby 60 sztuk z każdej odmiany. Jednowęzłowe fragmenty roślin przeszczepiono na pożywkę Murashige-Skooga (MS) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Klasyczna pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, mezoinozytu i sacharozy została zestalona agarem i poddana sterylizacji parą wodną (121°C) przez 15 min, a następnie pod komorą laminarną w sterylnych warunkach za pomocą filtrów strzykawkowych dodano do niej ustalone dawki preparatów: PPM 0,3%, 0,5% i 0,7%, a ProClin 0,01%, 0,02% i 0,03%. Dawki biocydów wybrano na podstawie zaleceń producentów oraz w oparciu o stężenia stosowane przez badaczy dla innych gatunków roślin. Kontrolę stanowiło podłoże standardowe MS bez dodatku biocydów.

Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie przez 4 tygodnie w temperaturze 20-22°C, przy 16-godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W·m². Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano trzeciego dnia po wszczepieniu eksplantatów. Do siódmego dnia można było obserwować zmętnienie podłoża, wskazujące na obecność bakterii endogennych. Przez kolejne tygodnie opisywano wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin i współczynnik rozmnażania oraz fitotoksyczne działanie

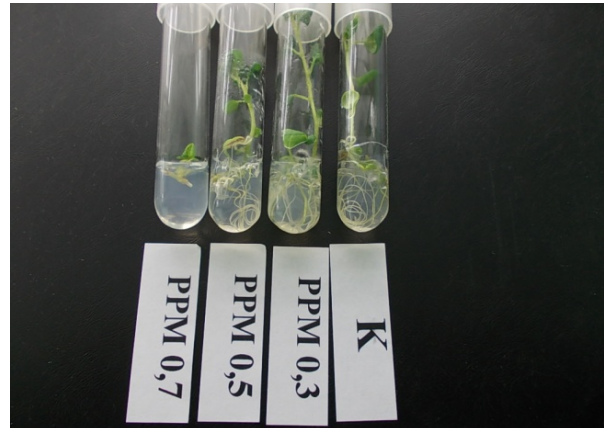
zastosowanych preparatów. Doświadczenie wykonano w 4 powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślin w każdej kombinacji plus obiekt kontrolny.

Wyniki i dyskusja

Reakcja badanych genotypów na zastosowane biocydy była zróżnicowana. Eksplantaty wszczepione na podłoże z PPM rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeniły (fot. 1).



Fot. 1. Reakcja roślin *in vitro* na zastosowane dawki PPM (wszystkie zdjęcia. D. Sekrecka)



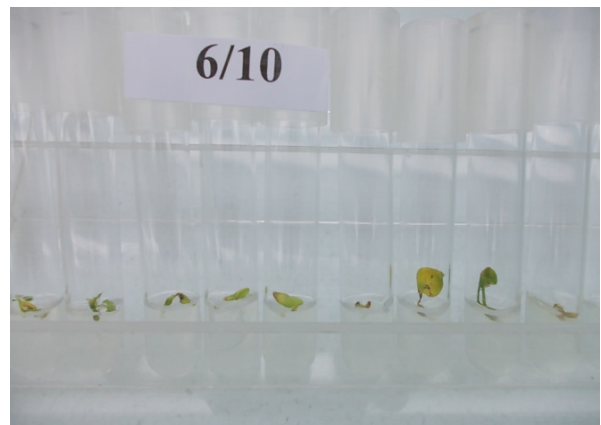
Fot. 2. Wpływ dodatku różnych dawek PPM na wzrost i rozwój roślin *in vitro*

ProClin (fot. 3) w zastosowanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne średnio w 93% kultur – zakres 82-100% (tab. 1). Jednak w wyższych dawkach (0,03%) okazał się silnie fitotoksyczny w stosunku do roślin ziemniaka *in vitro* (fot. 4).

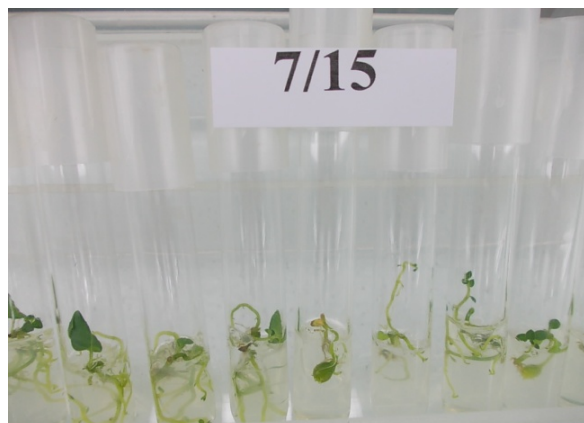


Fot. 3. Reakcja roślin *in vitro* na różne dawki ProClin

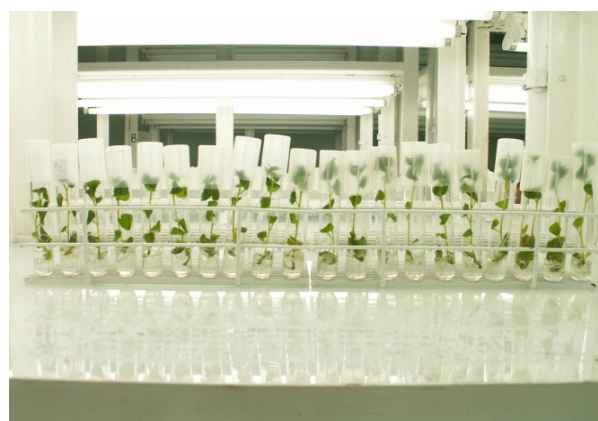
W miejscu zetknięcia eksplantatu z pożywką następowało bielenie łodygi i powolne jego zamieranie. Przy niższych dawkach (0,01%) część eksplantatów rosła, lecz rośliny były słabsze od kontrolnych, które rosły na pożywce bez dodatku biocydu (fot. 5 i 6).



Fot. 4. Fitotoksyczny wpływ dawki 0,03% ProClin na eksplantaty ziemniaka



Fot. 5. Reakcja roślin *in vitro* na zastosowane dawki ProClin



Fot. 6. Rośliny *in vitro* bez dodatku biocydów – kontrola

Tabela 1

Procent kultur *in vitro*, w których wizualnie nie stwierdzono bakterii endogennych w zależności od dawki preparatu bakteriobójczego (średnia z 4 cykli)

Biocyd	Dawka (%)	Odmiana 1	Odmiana 2	Odmiana 3	Odmiana 4	Średnia (%)
PPM	0,00	45,57	16,10	20,57	28,90	27,79
	0,30	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,50	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,70	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
ProClin	0,00	45,57	16,10	20,57	28,90	27,79
	0,01	75,57	82,23	68,90	77,77	76,12
	0,02	100,00	100,00	84,43	73,33	89,44
	0,03	100,00	95,57	95,57	82,23	93,34

Podsumowanie

Wykazano pozytywny wpływ PPM i ProClin na redukcję zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka. Jednak szczególnie ważne jest, aby preparaty bakteriobójcze stosować w odpowiedniej koncentracji, ponieważ przy wysokich stężeniach mogą być szkodliwe dla materiału roślinnego. Dlatego w celu określenia optymalnych dawek PPM i ProClin, które jednocześnie wyeliminują bakterie endogenne z pożywki i będą bezpieczne dla tkanek roślinnych, prowadzone są dalsze badania, rozszerzone o obserwację trwałości efektu bakteriobójczego biocydów w kolejnych pasażach roślin *in vitro*.

Literatura

1. Compton M., Koch J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. – *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 259-261; 2. Hegggers J. P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox

R., Zhao J. G. 2002. The effectiveness of processed grapefruit seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. – *J. Altern. Complement. Med.* 8(3): 333-340; 3. Kłama J. 2004. Współzycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Pr. przegl. – Acta Sci. Pol., Agricultura* 3(1): 19-28; 4. Orlikowska T., Zawadzka M. 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. *Pr. przegl. – Biotechnologia* 4(75): 64-77; 5. Orlikowska T., Sobiszewski P., Zawadzka M., Zenkteler E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro*. *Pr. przegl. – Biotechnologia* 2(89): 57-71; 6. Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofuril on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. – *J. Hortic. Sci. Biotech.* 87, 3: 223-230; 7. Reagor L., Gusman J., McCoy L., Carino E., Hegggers J. P. 2002. The effectiveness of processed grapefruit seed extract as an antibacterial agent: I. An *in vitro* agar assay. – *J. Altern. Complement. Med.* 8(3): 325-332; 8. Rihan H. Z., Al-Issawi M., Al-Swedi F., Fuller M. P. 2012. The effect of using PPM (plant preserva-

tive mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. – Sci. Hortic. 141: 47-52; **9. Wilson D. 1995.** Endophyte-

the evolution of a term and clarification of its use and definition. – Oikos 73, 274-276

