



BAKTERIOBÓJCZE DZIAŁANIE PREPARATU PPM W KULTURACH IN VITRO ZIEMNIAKA

D. Michałowska, A. Przewodowska, J. Piskorz, O. Olejnik

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut
Badawczy, Oddział w Boninie

michalowska@ziemniak-bonin.pl

Zanieczyszczenia bakteryjne są dużym problemem w rozmnażaniu in vitro wszystkich gatunków roślin, w tym i ziemniaka. Szczególnie ważne jest to w kulturach wieloletnich, które są podstawą w bankach genów in vitro. Źródła bakterii endogennych zazwyczaj są trudne do określenia, właściwie na każdym etapie mikrorozmnażania może dojść do zanieczyszczenia hodowli in vitro. Prawdopodobnie przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in. 2012). Objawem świadczącym o obecności bakterii endogennych, pojawiającym się kilka dni po pasażowaniu, jest zmętnienie podłoża pod wyszczepionym eksplantatem i wydzielające się wodniste „hallo”. Dezynfekcja eksplantatów umożliwia usunięcie bakterii jedynie z ich powierzchni. Całkowite odkażenie wewnętrznych tkanek jest niemożliwe z powodu fitotoksyczności środków odkażających. Jedynie dodanie do pożywki hodowlanej biocydu może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych (fot.1.).



MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły rośliny in vitro 4 odmian: Finezja, Gawin, Harpun i Michalina pozyskane z banku genów in vitro ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano Plant Preservative Mixture™ (PPM™) - mikstura, która jest biocydem o szerokim spektrum zastosowania i jest polecana w hodowli tkanek roślinnych. Stosowana przeciw bakteriom i grzybom rosnącym w pożywce, jak i w zanieczyszczonych tkankach. W zależności od dawki i stopnia zakażenia może pełnić funkcję składnika biostatycznego, jak i środka zapobiegawczego.

Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiano na pożywkę MS (Murashige, Skoog) z dodatkiem preparatu bakteriobójczego. Standardowa pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, myo-inozytolu, sacharozy i zestalona agarą (0,4%) z ustalonym pH na poziomie 5,8 została poddana sterylizacji parą wodną w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu, tj. temp. 121°C, ciśnienie 0,2 MPa i czas 15 minut. Do sterylnej pożywki, przy pomocy filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki preparatu: 0,3%; 0,4% ; 0,5%. Kultury in vitro utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16 godz dzień w temp. 22°C, oświetleniu 8 W·m⁻² i 8 godz noc w ciemności w temp. 20°C przez okres 4 tygodni. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano trzeciego dnia po wyszczepieniu eksplantatów. Do 7 dnia dokładnie można zaobserwować wystąpienie mgiełek, wskazujących na obecność bakterii endogennych. Przez kolejne tygodnie opisywano wzrost i rozwój roślin in vitro zwracając szczególną uwagę na skuteczność i fitotoksyczne działanie zastosowanego preparatu. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślin dla każdej kombinacji oraz kontrolę.

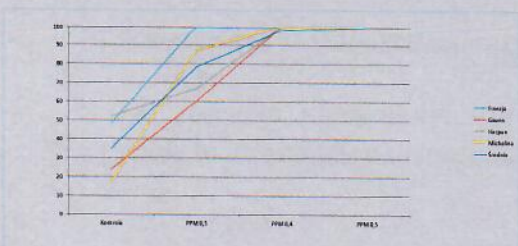
WYNIKI

Dodany do podłoża preparat PPM™ w różnych dawkach nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na wyszczepione eksplantaty, które rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeniły (fot.2, 3, 4.). Nawet najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne - 78,35%. Wyższe dawki – od 0,4% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych (tab.1., wyk.1.).

Tabela 1. Procent kultur in vitro, w których wizualnie nie stwierdzono bakterii endogennych w zależności od zastosowanej dawki biocydu (średnia z 4 cykli).

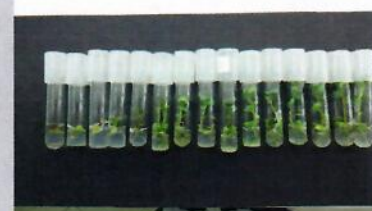
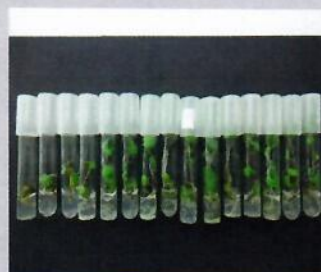
Dawka PPM™	Procent kultur wolnych od bakterii endogennych	Rodzaje odmian ziemniaka				
		Finezja	Gawin	Harpun	Michalina	Średnia
0		88,0	22,0	52	36,9	36,28
0,3		100	60	66,7	83,3	78,35
0,4		100	100	100	100	100
0,5		100	100	100	100	100

Wykres 1. Średni procent kultur in vitro, w których wizualnie nie stwierdzono obecności bakterii endogennych po zastosowaniu preparatu PPM™.



Dodatkowo sprawdzono trwałość efektu zastosowanego we wcześniejszych pasażach biocydu PPM™ na dalszych etapach mikrorozmnażania. Do badań wykorzystano rośliny in vitro, w których stwierdzono, że preparat w badanych dawkach ograniczył zanieczyszczenia. Zaobserwowano, że tylko fragmenty szczytowe były wizualnie czyste, tzn. nie zauważono zmętnienia podłoża. Pozostałe fragmenty były zanieczyszczone bakteriami endogennymi.

Fot. 2, 3, 4. Reakcja roślin na zastosowane dawki 0,3; 0,4 i 0,5% PPM.



WNIOSKI

1. Preparat PPM™ w badanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 78,35- 100% nie wykazując fitotoksycznego działania na rośliny in vitro.
2. Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki PPM™ wyeliminują bakterie endogenne z kultur in vitro ziemniaka.