Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW; 63

Tytuł zadania:  **Eliminacja patogenów niekwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro.***

Kierownik zadania: mgr inż. Dorota Michałowska

*Cel projektu:*

Głównym celem projektu są prace nad doskonaleniem metod uwalniania roślin ziemniaka od patogenów niekwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro.*

W 2019 roku w ramach zadania 63 prace badawcze prowadzono w dwóch tematach:

Temat 1. **Opracowanie metod skutecznego uwalniania od wirusów genotypów wprowadzanych do Banku Genów *in vitro* ziemniaka.**

*Cel tematu*

Głównym celem tematu badawczego jest dopracowywanie metod eliminacji wirusa S i M ziemniaka z genotypów gromadzonych w Banku Genów *in vitro*.

Choroby wirusowe stanowią główną przyczynę złej jakości sadzeniaków, prowadzą do degeneracji plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty plonu. Największe zagrożenie stanowi wirus Y ziemniaka, który może spowodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirusy S i M ziemniaka, które łatwo rozprzestrzeniają się, mogą powodować straty rzędu 30% (Kostiw 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a także są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego szczególnie ważne jest utrzymanie zdrowych, wolnych od wirusów materiałów wyjściowych ziemniaka w kulturach *in vitro* oraz opracowanie skutecznej metody eliminacji PVS, PVM i PVY z porażonego materiału wprowadzanego do Banku Genów.

Termoterapia

*Materiał i metody*

Bulwy trzech odmian: Linzer Starke porażona wirusem PVS, TE -1 z wirusem PVM i EF 55-8545 z wirusem PVY wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w fitotronie. Przez okres 4-5 tygodni rośliny poddane zostały działaniu wysokiej temperatury: 37/330C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W·m2 z zachowaniem 16 godzinnego fotoperiodu. W 5 tygodniu trwania termoterapii pobrano z roślin pąki kątowe i wyizolowano z nich merystemy. Z każdego genotypu merystemy izolowało 2 wykonawców i wyizolowano po ok. 130 merystemów. Przed izolacją merystemów materiał roślinny sterylizowano w 70% etanolu przez 20 sekund oraz w 1,5% roztworze chloraminy przez 15 minut. Następnie wykonano 4-krotne płukanie fragmentów roślin w sterylnej destylowanej wodzie. Z pąków kątowych izolowano merystemy wielkości 0,2-0,4mm i umieszczano je pojedynczo w probówkach na pożywce MS (Murashige, Skoog, 1962) zestalonej agarem (0,3%), z dodatkiem kinetyny 0,04 mg/l i kwasu giberelinowego (GA3) – 0,1 mg/l. Prowadzono sukcesywne obserwacje wyszczepionych merystemów, usuwając ewentualne zakażenia grzybowo-bakteryjne. W miarę wzrostu i rozwoju merystemy przeszczepiano na świeżą pożywkę aż do uzyskania roślin *in vitro.* Probówki z merystemami a następnie z roślinami *in vitro* utrzymywano w fitotronie w optymalnych warunkach dla ich rozwoju tj. 16 godzin na świetle w temperaturze 220C oraz przez 8 godzin w ciemności w temperaturze 200C.

*Wyniki*

Z genotypów Linzer Starke, TE -1 i EF 55-8545 poddanych termoterapii wyizolowano 272 merystemy. Pąki kątowe zostały podzielone między dwóch wykonawców. Duży problem w uwalnianiu stwarza wirus PVS, dlatego izolowano w miare możliwości tylko kopułę merystematyczną. W zależności od wykonawcy uzyskano 55% zregenerowanych roślin z wyizolowanych merystemów, w tym 31% roślin wolnych od wirusa S ziemniaka – wykonawca 1 i 33% zregenerowanych roślin, w tym 16,6% zdrowych – wykonawca 2. Z odmiany zainfekowanej wirusem PVM w zależności od wykonawcy uzyskano 60% zregenerowanych roślin *in vitro*, w tym 70% wolnych od PVM – wykonawca 1 oraz 47,8% zregenerowanych roślin, w tym zdrowych 45,5% - wykonawca 2. Z kolei wirus Y ziemniaka jest wirusem, który łatwo uwalnia się pod wpływem działania wysokiej temperatury i w zależności od wykonawcy uzyskano 79% roślin zregenerowanych, z czego 93% wolnych od PVY – wykonawca 1 i 69% roślin zregenerowanych, w tym wolnych od PVY 77,8% - wykonawca 2.

*Dyskusja*

Przez lata wielu badaczy próbowało znaleźć sposób na wyeliminowanie wirusów z roślin. Już w 1952r. ukazały się w literaturze pierwsze informacje o tym, że wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane z nich merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin 1952). Zjawisko eliminacji wirusów w całych roślinach pod wpływem wysokiej temperatury po raz pierwszy zostało opisane przez amerykańskiego badacza L. O. Kunkela (1936). Kolejne badania wykazały, że liczba roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam, Tedesse 2008). Jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Ali i in. 2013). Merystemy nie mają połączenia z systemem naczyniowym rośliny, za pomocą którego rozprzestrzeniają się wirusy. Dlatego po ich wypreparowaniu otrzymuje się eksplantaty o najniższej koncentracji patogenów (Panattoni 2013). Na uzyskane wyniki wpływa staranność wykonawców w izolowaniu merystemów. Im mniejszy wyizolowany merystem, tym większe prawdopodobieństwo uzyskania roślin zdrowych. Duże znaczenie ma precyzyjne cięcie eksplantatów i szybkie umieszczenie ich na pożywce w taki sposób, aby powierzchnia cięcia przylegała do podłoża. W przypadku uszkodzenia tkanki lub zbyt późnego umieszczenia merystemu na pożywce można doprowadzić do ich obumierania. Przeprowadzone badania potwierdziły, jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin in vitro ma czynnik ludzki.

*Wnioski*

1. Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa PVS, PVM i PVY poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na co składa się precyzja i wielkość izolowamego merystemu.
2. Kultura merystemów w połączeniu z termoterapią jest obecnie standardowo stosowana w celu uzyskania zdrowych, wolnych od patogenów roślin ziemniaka.

Chemioterapia.

*Materiał i metody*

Rośliny *in vitro* 5 odmian tj. Linzer Starke, Eugenia (PVS), TE-1, Giewont (PVM) i EF 55-8545 (PVY), u których testem DAS ELISA stwierdzono wysokie porażenie wirusami poddano działaniu dwóch substancji antywirusowych: rybawiryny i tiouracylu. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS (Murashige, Skoog) zestalonej agarem (0,4%) z dodatkiem rybawiryny lub tiouracylu. Pożywkę MS z ustalonym pH na poziomie 5,8 poddano sterylizacji 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 rybawiryny i tiouracylu. W 2019 roku dawki rybawiryny zostały nieznacznie zmniejszone w stosunku do dawek z 2018 roku i były to 30, 35 i 40 mg/l pożywki (wyższe dawki powodowały fitotoksyczne działanie na rośliny *in vitro*). Natomiast dawki tiouracylu zostały zwiększone w stosunku do dawek z 2018 roku i były to 0,5, 1,0 i 1,5 mg/l pożywki. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczepione na pożywkę bez dodatku antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16 godz dzień w temp. 22°C, oświetleniu 8 W·m² i 8 godz noc w ciemności w temp. 20°C przez okres 3-4 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tzn. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, ulistnienie i współczynnik rozmnożenia (liczba międzywęźli). W 4 tygodniu z każdej kombinacji wysadzono rośliny w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 3-4 tygodniach wyrosłe sadzonki przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach.

*Wyniki*

W roku sprawozdawczym zastosowano niższe dawki rybawiryny i wyższe tiouracylu w stosunku do dawek z 2018 roku.

Rybawiryna dodana do podłoża w dawkach 30, 35 i 40 mg/l nieznacznie obniżyła poziom ekstynkcji wirusa PVS, spadek koncentracji wirusa był wprost proporcjonalny do stężenia.W eliminacji wirusa PVM zastosowana rybawiryna nie miała wpływu na obniżenie poziomu ekstynkcji. Z kolei odnotowano silnie obniżenie poziomu PVY w roślinach *in vitro*, ale nie jego całkowitą eliminację. Rośliny *in vitro* rosły prawidłowo, jednak wraz ze wzrostem stężenia antymetabolitu zaobserwowano fitotoksyczne jego działanie na rośliny *in vitro* w stosunku do kontroli.

Dodatek do pożywki różnych dawek tiouracylu: 0,5, 1,0 i 1,5 mg/l w niewielkiem stopniu obniżył ekstynkcję wirusa PVS. Nie miał wpływu na eliminację wirusa M ziemniaka z badanych odmian, natomiast obniżył ekstynkcję wirusa PVY. Eksplantaty wyszczepione na podłoże z dodatkiem tiouracylu rozwijały się prawidłowo i dobrze korzeniły się.

*Dyskusja*

Antymetabolity stosowane w chemioterapii są to analogi nukleotydów, o wysokiej aktywności przeciwwirusowej, włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym, hamując tym samym ich namnażanie (Malepszy 2001). Nasir i in. (2010) oraz Mahmoud i in. (2009) zaobserwowali, że rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, natomiast tiouracyl sporadycznie eliminował PVS (Condrad i in 1991) oraz wirusa PVX. Stosowanie antymetabolitów ma również wady, gdyż wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywce nastepuje proporcjonalny wzrost liczby roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii, ale zmniejsza się liczba roślin zdolnych do regeneracji (Nasir i in. 2010, Mahmoud i in. 2009). W 2014 roku Yang i in. przeprowadzili ocenę skuteczności rybawiryny w eliminacji wirusów z roślin ziemniaka. W badaniach zastosowali bardzo wysokie dawki RBV: od 75 do 200 mg/l pożywki i udowodnili skuteczność rybawiryny w eliminacji wirusów z roślin ziemniaka. Jednocześnie stwierdzili,że wysokie dawki mają fitotoksyczne działanie na pasażowane eksplantaty. Nasze badania potwierdziły, że wyższe dawki RBV obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, ale jednocześnie wraz ze wzrostem stężenia negatywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin. Niższe dawki rybawiryny oznaczają mniejszy procent wolnych od wirusa S ziemniaka roślin *in vitro*. Zastosowane dawki tiouracylu zmniejszyły koncentrację wirusa PVS i PVY, jednocześnie nie działając fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty. Można przypuszczać, że stosując wyższe dawki tiouracylu, otrzymamy rośliny wolne od PVS i PVY. Jeśli chodzi o wirusa M ziemniaka, zarówno rybawiryna jak i tiouracyl nie poradziły sobie z jego eliminajcą.

*Wnioski*

1. Rybawiryna dodana do pożywki nieznacznie zmniejsza koncentrację wirusa PVS wprost proporcjonalnie do stężenia.
2. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM.
3. Rybawiryna ma wpływ na zmniejszenie koncentracji wirusa PVY.
4. Wraz ze wzrostem stężenia rybawiryny w podłożu wprost proporcjonalnie wzrasta jego fitotoksyczne działanie na rośliny *in vitro*.
5. Tiouracyl dodany w badanych dawkach do pożywki wpłynął na zmniejszenie stężenia wirusa PVS.
6. Dodatek tiouracylu rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM.
7. Zastosowane dawki tiouracylu zmniejszyły ekstynkcję wirusa PVY.
8. Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*

*Cytowana literatura*

Ali M. A., Nasiruddin K. M., Haque M.S., Faisal S.M.2013. Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARA J. Agri 11(1): 71-80;

Biniam T., Tedesse M. 2008. A survey of Vidal ststus on potatoes grown in Eritrea and in vitro elimination of local variety Tsaeda embaba. Afr. J. Biotech. 7(4): 397-403;

Condrad L. P. 1991. Potato virus S-free plants obtained using antiviral compounds and nodal segment culture of potato. Am. J. Potato Res. 68: 507-513;

Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. Wieś Jutra 3(20): 27-29;

Kostiw M. 2013. Przyrodnicze i pozaprzyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. Wieś Jutra 1(174): 28-29;

Kunkel L. O. 1936. Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. – Phytopathology 26: 809-830;

Mahmound S.Y.M., Hosseny M.H., Abdel-Ghaffar M.H. 2009. Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. Int. J. Virol.5(2): 64-76;

Malepszy S. 2001. Biotechnologia roślin. PWN. Warsyawa. 36;

Morel G., Martin C. 1952. Cure of dahlias attacked by a virus disease. C.R. Hebd Seances Acad.Sci.235(21):1324-5;

Nasir I.A. Tabassum B., Latif Z., Javed M.A., Haider M.S., Husnain T. 2010. Strategies to control potato virus Y under in vitro conditions. Pak. J. Phytopatol. 22b(1): 63-70;

Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. 2013. Review of viruses in plants: twenty years of Progress. – Span. J. Agric**. Res. 11(1): 173-188;**

Yang L., Nie B,, Jun Liu, Song B. 2014. A Reexamination of the Effectiveness of Ribavirin on Eradication of Viruses in Potato Plantlets in vitro Using ELISA and Quantitative RT-PCR. Am. J. Porato Res. 91:304-311;

Zaklukiewicz K. 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. Ziemniak 1981/82: 137-160.

Temat 2. **Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka**

*Cel tematu*

Celem tematu w 2019 roku było badanie trzech dostepnych na rynku preparatów bakteriobójczych pod kątem skuteczności zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności. Zaplanowane badania wykonano w 100%.

Bakterie endogenne są problemem, króry pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro* niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikrorozmnażania nie daje pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno jest powiedzieć o kulturach *in vitro*, że są sterylne. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie wzrostu nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in. 2012). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. Proces ten ujawnia się po kilku (3-5) dniach od pasażowania. Dodanie biocydu do podłoża może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych. Na rynku dostępnych jest wiele preparatów bakteriobójczych m.in.: PPM™, ProClin300®, Citrosept, azotan srebra, podchloryn sodu (NaClO), liczne antybiotyki i olejki eteryczne.

*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 trzy: Plant Preservative Mixture ™ (PPM™), ProClin300® i podchloryn sodu (NaClO). Preparaty te są stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych gatunków roślin, brakuje jednak informacji na temat stosowania ich w kulturach *in vitro* ziemniaka. Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiano na pożywkę MS (Murashige, Skoog) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Standardowa pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, myo-inozytolu, sacharozy i zestalona agarem (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 komora laminarną, dodano ustalone dawki preparatów. W 2019 roku preparaty dodano w następujacych stężeniach:

Plant Preservative Mixture (PPM™): Kontrola; 0,3%; 0,4% ; 0,5%

ProClin300®: Kontrola; 0,02%; 0,03%; 0,04%

Podchloryn sodu (NaClO): Kontrola; 0,0002%; 0,0005%; 0,001%.

Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie z zachowaniem fotoperiodu 16 godz dzień w temp. 22°C, oświetleniu 8 W·m² 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 zastosowanych preparatów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślindla każdej kombinacji oraz kontrolę.

Dodatkowo sprawdzono trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów: PPM™, ProClin 300® na dalszych etapach mikrorozmnażania. Do badań wykorzystano rośliny *in vitro*, w których stwierdzono, że preparat w badanych dawkach ograniczył zanieczyszczenia. Z każdej dawki preparatu PPM™ i Pro Clin 300® pasażowano po 2 rośliny na jednowęzłowe fragmenty na podłoże MS bez dodatku biocydu i utrzymywano w fitotronie w temperaturze 20/18ºC (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 8 W·m² z zachowaniem 16 godzinnego fotoperiodu przez okres 2 tygodni. W pierwszym tygodniu po przeszczepieniu fragmentów roślin na pożywkę MS przeprowadzono obserwację ewentualnego występowania bakterii endogennych w kulturach *in vitro*. Próba: 48 roślin na powtórzenie (tj. 4 odmiany po 12 sztuk roślin) x 3-4 powtórzenia.

*Wyniki*

W 2019 roku w zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do podłoża preparat PPM™, podobnie jak w latach poprzednich nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty. Rośliny rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeniły. Osiągnęły wysokość ok. 8-10 cm, a współczynnik rozmnożenia, w zależności od genotypu, wynosił od 5 do 9. Najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne – 88,9% czystych kultur. Wyższe dawki 0,4 i 0,5% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych.

Dodatek do pożywki ProClin300® przy dawkach 0,02 i 0,03% eliminował bakterie endogenne w 74,5-93%, jednocześnie nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin in vitro. Natomiast najwyższa dawka 0,04% wyeliminowała całkowicie zanieczyszczenia bakteryjne. Jednak przy wyższej dawce rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli.

Podchloryn sodu (NaClO) dodany do pożywki przy niższych dawkach 0,0002-0,0003% eliminował bakterie endogenne u ok. 50% roślin, natomiast najwyższa dawka 0,001% całkowicie wyeliminowała endofity. Jednocześnie nie zaobserwowano szkodliwego działania na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Sprawdzając trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów: PPM™ i ProClin 300® na dalszych etapach mikrorozmnażania zaobserwowano, że tylko fragmenty szczytowe były wizualnie czyste, tzn. nie zaobserwowano zmętnienia podłoża. Pozostałe fragmenty były zanieczyszczone bakteriami endogennymi. Jednak pasażując roślinę wyrosłą ze szczytowego fragmentu na podłoże bez biocydu, po kilku dniach wokół eksplantatu pojawiało się wodniste „hallo” wskazujące na obecność bakterii endogennych. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin in vitro ziemniaka to maksymalnie 2 pasaże.

*Dyskusja*

Po raz pierwszy bakterie endogenne zostały zdefiniowane przez Wilsona (1995) jako mikroorganizmy żyjące wewnątrz rośliny. Z kolei Strobel (2004) dodał, że każda roślina jest gospodarzem dla kilku gatunków bakterii i grzybów, jednak na ogół jeden lub dwa są dominujące. Zanieczyszczenia endofitami 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*. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych, dlatego konieczne jest eksperymentalne wybranie odpowiedniego biocydu i ustalenie jego stężenia w odniesieniu do konkretnego gatunku rośliny. Biocyd PPM™ został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, tytoń (Compton, Koch 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ preparatu w ograniczeniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę, że musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku roślin, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej (Rihan i in 2012). W 2006 roku Thomas i wsp. zaobserwowali, że po odkażeniu powierzchniowym eksplantatów arbuza podchlorynem sodu (NaClO), bakterie utajone (ang. *cryptic, covert*) zanikały. Dane literaturowe mówią o pozytywnym działaniu zarówno ProClin 300®, jak i podchlorynu sodu (NaClO) w usuwaniu endofitów w kulturach innych roślin, nie ma natomiast informacji na temat ich wykorzystania w kulturach *in vitro* ziemniaka.

W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM™ i ProClin 300® na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka. Niestety preparaty te nie powodują trwałego „oczyszczenia”, tzn. po przeszczepieniu roślin *in vitro* z podłoża z dodatkiem biocydu na standardowe podłoże MS tylko wierzchołkowe fragmenty roślin zachowały czystość bakteryjną. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin *in vit*ro ziemniaka to maksymalnie 2 pasaże. Podchloryn sodu (NaClO) w najwyższej dawce także w 100% wyeliminował endofity w kulturach *in vitro* ziemniaka nie wykazując fitotoksycznego działania na rośliny.

*Wnioski*

1. Preparat PPM™ w badanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 88,9- 100% nie wykazując fitotoksycznego działania na rośliny *in vitro*.
2. Zsatosowane dawki ProClin 300® eliminowały występowanie zanieczyszczeń endogennych w 74,5-100%, tylko najwyższa dawka wpłynęła na słabszy wzrost i rozwój roślin *in vitro*.
3. Podchloryn sodu (NaClO) w niższych dawkach w ok. 50% eliminował zanieczyszczenia bakteryjne.
4. Wyższe dawki NaClOcałkowicie wyeliminowały endofity, jednocześnie nie zaobserwowano fitotoksycznego działania związku na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.
5. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin *in vit*ro ziemniaka to maksymalnie 2 pasaże.

*Cytowana literatura*

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;

Heggers 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. 2002 Jun. 8(3): 333-40;

Klama J. 2004. Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. Pr. Przegl. – Acta sci. Pol., Agricultura 3(1); 19-28;

Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofural on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. J. Hortic. Sci Biotech.. 87,3:223-230;

Reagor L., Guzman J., Mc Coy L., Carino E., Heggers 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): 325-32;

Rihan H. Z., Al.-Issawi M., Al.-Swedi F., Fuller M. P. 2012. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower mikroshoots ant the quality of artificial seed produced. – Sci. Hortic. 141: 47-52;

Thomas P., Swaryna G.K., Roy P. K., Patil P. 2008. Plant Cell. Tiss. Organ Cult. 93: 55-63;

Wilson D. 1995. Endophyte – the evolutionof a term and clarification of its use and definitione. – Oikos 73: 274-276.