

WPŁYW PREPARATÓW DO ZWALCZANIA ZANIECZYSZCZEŃ BAKTERYJNYCH NA ROŚLINY ZIEMNIAKA W KULTURACH IN VITRO

IMPACT OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS ON POTATO PLANTS IN "IN VITRO" CULTURES

mgr inż. Dorota Michałowska

IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl

Streszczenie

Kultury *in vitro* umożliwiają produkcję dużej liczby roślin potomnych w krótkim czasie z niewielkiej ilości materiału biologicznego. Powielanie materiału roślinnego (mikrorozmnażanie) musi odbywać się z zachowaniem szczególnych warunków sterylności, zapewniających uzyskanie zdrowego materiału rozmnożeniowego. Bakterie endogenne, określane jako bakterie towarzyszące lub utajone (ang. covert), stanowią problem dla kultur *in vitro* niezależnie od gatunku rośliny. Włączenie do pożywek, w których rosną rośliny, związków bakteriobójczych i bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością. W przeprowadzonych badaniach za najbardziej przydatne biocydy uznano Plant Preservative Mixture (PPM™) w stężeniu 0,4-0,5%, ProClin300® 0,02-0,03% oraz podchloryn sodu (NaClO) 0,001%. CitroseptOrganic i azotan srebra (AgNO₃) należy wykluczyć ze stosowania ze względu na fitotoksyczność oraz niekorzystny wpływ na rozwój pędów i korzeni mikrosadzonek ziemniaka, natomiast preparat Nitrofurazone – z powodu braku działania bakteriobójczego.

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

Abstract

In vitro cultures enable the production of a large number of offspring plants in a short time from a small amount of biological material. Reproduction of plant material through micro-propagation must take place under sterile conditions that ensure obtaining healthy propagating material. Endogenous bacteria, referred to as companion or covert bacteria, are a problem for *in vitro* cultures regardless of plant species. The incorporated into the plant growth media bactericidal and bacteriostatic compounds must be safe for plant tissues, and therefore research on their effectiveness and phytotoxicity is essential. In the conducted studies, Plant Preservative Mixture (PPM™) at a concentration of 0.4-0.5%, ProClin300® 0.02-0.03%, and sodium hypochlorite (NaClO) 0.001% were the most useful biocides. CitroseptOrganic and silver nitrate (AgNO₃) should be excluded from the use due to phytotoxicity and adverse effect on the development of shoots and roots of potato micro-seedlings, while Nitrofurazone - due to the lack of bactericidal activity.

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

Genotypy ziemniaka (odmiany i rody perspektywiczne) gromadzone w postaci roślin *in vitro* w Banku Genów w Boninie są źródłem materiałów wyjściowych dla hodowli zachowawczej i twórczej ziemniaka oraz dostarczają materiał roślinny do badań innym placówkom naukowym. Istotnym elementem utrzymywania i udostępniania kolekcji *in vitro* ziemniaka jest zapewnienie jej wysokiej zdrowotności.

Bakterie endogenne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in*

vitro niezależnie od gatunku roślin. Okazało się, że nawet największa staranność w procesie mikrorozmnażania nie daje pewności otrzymania i rozmnażania roślin bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno powiedzieć o kulturach *in vitro*, że są sterylne. Endofitami nazywa się wszystkie organizmy, „które przez dłuższy lub krótszy okres swojego życia kolonizują bezobjawowo żywe tkanki wewnętrzne swojego gospodarza” (Aust 2001). Bakterie endogenne znajdują się na powierzchni rośliny, w jej tkance przewodzą-

cej, w przestrzeniach międzykomórkowych, a także wewnątrz komórek (Pirttilä i in. 2000). Endofity mogą oddziaływać na rośliny w różny sposób: hamować ich rozwój lub stymulować bądź pozostawać obojętnymi w stosunku do organizmu gospodarza (Strzelczyk 2001). Obecność bakterii – czy to patogenicznych, czy niepatogenicznych, a nawet pożytecznych – jest w kulturach *in vitro* niepożądana.

Najczęstszym źródłem bakterii wnoszonych do kultur jest eksplantat inicjalny, czyli bardzo mały fragment wierzchołka rośliny zawierający merystem i zawiązki najmłodszych liści (Malepszy 2001). Im mniejsza sadzonka jest wprowadzana do kultur, np. merystem wierzchołkowy lub boczny, tym większa szansa, że zanieczyszczenie bakteriami będzie mniejsze. Bakterie w roślinie przenoszą się przede wszystkim przez system naczyniowy, a merystem, nie mając połączenia z tkanką przewodzącą, jest na ogół od nich wolny. Dlatego ważne jest stosowanie skutecznej procedury odkażania eksplantatów inicjalnych. Obejmuje ona kilka etapów: płukanie w wodzie bieżącej, płukanie w wodzie z detergentem, płukanie w alkoholu, odkażanie zasadnicze sublimatem rtęci lub podchlorynem wapnia czy sodu, zakończone płukaniem w sterylnej wodzie (Orlikowska i in. 2010).

Pomimo stosowania szczególnych środków sterylności w prowadzeniu kultur *in vitro* i utrzymywania sterylnych warunków pracy bakterie mogą ujawnić się nagle na każdym etapie mikrorozmnażania. Istotnie sprzyja temu wydłużenie czasu inkubacji na „starej” pożywce, a także zmiany warunków prowadzenia kultury: temperatury lub oświetlenia. Często w kulturach *in vitro* bakterie endogenne występują w stanie utajonym w eksplantatach, powoli się namnażają i mogą ujawnić się po kilku lub kilkunastu pasażach.

Objawem obecności bakterii w pożywce są nacieki, zmętnienia lub przebarwienia pod eksplantatem, a także pojawiająca się po kilku dniach po pasażowaniu wodnista obwódka wokół eksplantatu (fot. 1).



Fot. 1. Wodnista obwódka (halo) wokół eksplantatu świadcząca o obecności bakterii endogennych w kulturach *in vitro* (wszystkie zdjęcia D. Michałowska)

Zanieczyszczenia endofitami są dużym problemem w rozmnażaniu *in vitro* wszystkich gatunków roślin, w tym i ziemniaka. Laboratoria mikrorozmnażania roślin na całym świecie próbują opracować skuteczną metodę eliminacji bakterii endogennych z kultur tkankowych. Jedną z testowanych metod jest dodatek do podłoża wzrostowych bakteriocydów i bakteriostatyków, które mają za zadanie zahamować namnażanie bakterii. W kulturach *in vitro* właściwy efekt leczniczy zapewni dobrze dobrany biocyd w odpowiednim stężeniu, o dobrej rozpuszczalności, stabilny w podłożu, nieindukujący odporności, bez działań ubocznych, nietoksyczny dla tkanek roślinnych, a jednocześnie pozwalający uzyskać eksplantaty wolne od zakażeń mikrobiologicznych i o prawidłowej zdolności regeneracyjnej (Falkiner 1997).

W ramach zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w latach 2014-2020 w Pracowni Zasobów Genowych i Kultur *in vitro* w Boninie przetestowano kilka preparatów bakteriobójczych, realizując temat „Eliminacja patogenów niekwartanowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro*”, finansowany przez MRiRW w ramach programu „Postęp biologiczny w produkcji roślinnej w latach 2014-2020”. W badaniach stosowano preparaty, które po dodaniu do podłoża miały ograniczyć rozmnażanie się bakterii endogennych, nie po-

wodując fitotoksycznego działania na rośliny in vitro. Z dostępnych na rynku przetestowano: Plant Preservative Mixture (PPM™), ProClin300®, Nitrofurazone, CitroseptOrganic, azotan srebra i podchloryn sodu. 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.

1. **Plant Preservative Mixture (PPM™)** to biocyd o szerokim zakresie zastosowania, polecany w hodowli tkanek roślinnych, stosowany przeciw bakteriom i grzybom rosnącym zarówno w pożywce, jak i w zanieczyszczonych tkankach. Został przetestowany dla wielu gatunków roślin, m.in. cytrusowych, kapustnych, melona, tytoniu (Compton, Koch 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ preparatu w ograniczaniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę, że musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku rośliny, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej (Rihan i in. 2012).

2. **ProClin300®** jest biocydem oraz konserwantem do odczynników stosowanych w diagnostyce in vitro. W literaturze przedstawiany jest jako wysoce efektywny środek z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności, a także niskiej toksyczności. Nie wykazywał fitotoksyczności wobec eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty.

3. **Nitrofurazone** (5-nitro-2furaldehydesemicarbazone) jest stosowany m.in. do rozmnażania in vitro bananów, ananasa i trzciny cukrowej. Chemioterapeutyk o działaniu bakteriostatycznym, a w większych stężeniach bakteriobójczym w stosunku do drobnoustrojów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Również oceniany jest jako preparat bakteriobójczy o szerokim spektrum.

4. **CitroseptOrganic** to ekstrakt z pestek grejpfruta (GSE), środek bakteriobójczy, grzybobójczy i naturalny konserwant. M.in. według badań opublikowanych w 2002 r. (Heggors i in. 2002, Reagor i in. 2002) GSE wykazuje właściwości przeciwbakteryjne dla wielu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

5. **Azotan srebra (Ag NO₃)** to związek bakteriobójczy od lat jest stosowany np. do

odkażania wody. Był używany w kulturach in vitro. Dodatek 10 mg/l azotanu srebra znacznie ograniczał zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach pomidora, bez wpływu na morfogenezę eksplantatów (Kubota, Tadokoro 1999).

6. **Podchloryn sodu (NaClO)** to nieorganiczny związek chloru stosowany zarówno do odkazania powierzchniowego roślin, jak i jako dodatek do pożywki przeciw bakteriom i grzybom.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny in vitro czterech odmian pozyskane z banku genów in vitro ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Jednowęzłowe fragmenty roślin umieszczano w pożywce MS (Murashige, Skoog) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Standardowa pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, myo-inozytolu, sacharozy i zestalona agarą (0,4%), z pH ustalonym 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, za pomocą filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki preparatów.

Biocydy dodano w stężeniach:

- Plant Preservative Mixture (PPM™): 0,3, 0,4 i 0,5% + obiekt kontrolny;
- ProClin300®: 0,02, 0,03 i 0,04% + obiekt kontrolny;
- Nitrofurazone: 0,4, 0,5 i 0,6% + obiekt kontrolny;
- CitroseptOrganic: 0,2%, 0,3% i 0,4% + obiekt kontrolny;
- azotan srebra (AgNO₃): 0,05, 0,1 i 0,15% + obiekt kontrolny;
- podchloryn sodu (NaClO): 0,0002, 0,0005 i 0,001% + obiekt kontrolny.

Dawki preparatów wybrano na podstawie zaleceń producentów oraz stężeń stosowanych w przypadku innych gatunków roślin. Próbę kontrolną stanowiły rośliny przeszczepione na standardowe podłoże MS bez dodatku preparatów bakteriobójczych. Kultury in vitro utrzymywano w fitotronie przez 4 tygodnie z zachowaniem fotoperiodu 16 godz. dzień w temp. 22°C i oświetleniu 8 W/m² oraz 8 godz. noc w ciemności w temp.

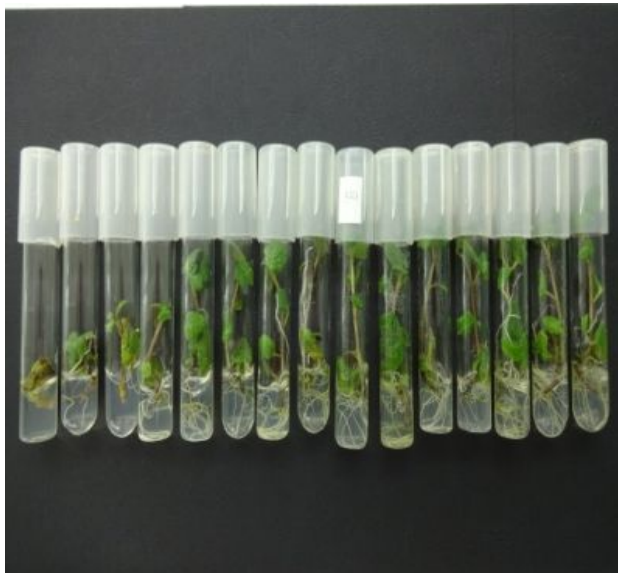
20°C. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano 3. dnia po przeszczepieniu eksplantatów. Do 7. dnia dokładnie można zaobserwować wystąpienie mgielek wskazujących na obecność bakterii endogennych. Przez kolejne tygodnie opisywano wzrost i rozwój roślin *in vitro*, zwracając szczególną uwagę na skuteczność i fitotoksyczne działanie zastosowanych preparatów. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślin każdej kombinacji oraz obiekt kontrolny.

Wyniki i dyskusja

W zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do podłoża PPM™ nie miał fitotoksycznego wpływu na rośliny, które rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeni-

ły. 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. Po zastosowaniu wyższych dawek – 0,4 i 0,5% – wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych było 100% kultur (fot. 2).

Dodatek do pożywki ProClin300® w dawkach 0,02 i 0,03% eliminował bakterie endogenne w 74,5-93% i jednocześnie nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin *in vitro* (fot. 3). Natomiast najwyższa dawka – 0,04% – wyeliminowała całkowicie zanieczyszczenia bakteryjne. Jednak przy wyższej dawce rośliny słabiej się korzeniły i rosły niższe w stosunku do obiektu kontrolnego.



Fot. 2. Reakcja roślin na dawkę 0,4% PPM



Fot. 3. Reakcja roślin na dawkę 0,03% ProClin

Dodanie do pożywki Nitrofurazone nie miało wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro*. Biocyd nie miał negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin (fot. 4).

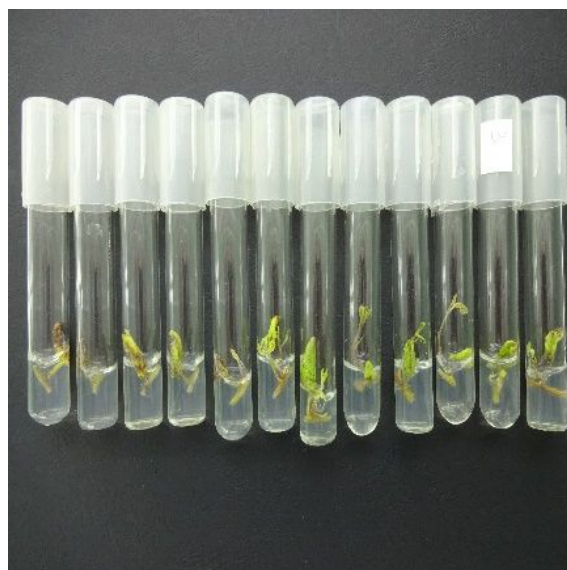
CitroseptOrganic w dawce 0,2% eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 40%, natomiast w wyższych dawkach – 0,3 i 0,4% – uzyskiwano ok. 60% czystych kultur, ale znacznie słabsze rośliny *in vitro*. Stwierdzono toksyczne oddziaływanie biocydu na eks-

plantaty na etapie namnażania i ukorzenia. Objawy wystąpiły w postaci deformacji roślin (fot. 5).

Azotan srebra (AgNO_3) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian. Dodatkowo przeszczepione fragmenty roślin zareagowały na niego, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobulwkami (fot. 6).



Fot. 4. Reakcja roślin na dawkę 0,6% Nitrofurazone



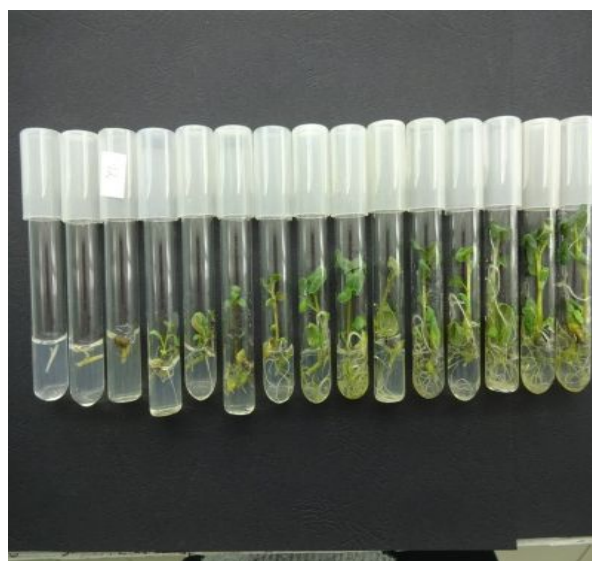
Fot. 5. Reakcja roślin na dawkę 0,2% CitroseptOrganic

Podchloryn sodu (NaClO) dodany do pożywki w niższych dawkach – 0,0002-0,0003% – eliminował bakterie endogenne u ok. 50% roślin, natomiast najwyższa daw-

ka, 0,001%, całkowicie wyeliminowała endofity. Jednocześnie nie zaobserwowano szkodliwego działania na wzrost i rozwój roślin in vitro (fot. 7).



Fot. 6. Tworzenie się bulw po zastosowaniu dawki 0,15% azotanu srebra (AgNO_3)



Fot. 7. Reakcja roślin na dawkę 0,001% podchlorynu sodu (NaClO)

Tabela 1

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

Biocyd	Dawka (%)	Procent "czystych" kultur in vitro w odmianach				
		odmiana 1	odmiana 2	odmiana 3	odmiana 4	średnia (%)
PPM™	0	28,4	17,4	16,8	10,7	18,3
	0,3	100,0	100,0	69,0	86,4	88,9
	0,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ProClin 300®	0	33,4	20,8	15,5	8,6	19,6
	0,02	75,5	68,9	77,3	76,12	74,5
	0,03	100,0	82,2	100,0	89,6	93,0
	0,04	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Nitrofurazone	0	0	0	0	0	0
	0,4	0	0	3,33	0	0,87
	0,5	0	0	0	0	0
	0,6	0	0	1,67	0	0,42
CitroseptOrganic	0	45,57	16,1	20,57	28,9	27,79
	0,2	88,9	32,23	23,33	13,33	39,45
	0,3	68,87	55,57	68,63	64,43	64,38
	0,4	88,9	63,33	42,77	57,77	63,19
AgNO ₃	0	45,57	46,9	30,0	16,9	34,84
	0,05	13,3	0	13,3	0	6,65
	0,1	13,3	6,7	20,0	0	10,0
	0,15	53,3	6,7	20,0	6,7	21,67
NaClO	0	30,5	17,7	33,2	20,0	25,4
	0,0002	45,5	50,7	68,0	55,7	55,0
	0,0005	40,8	60,4	57,0	39,0	49,3
	0,001	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Podsumowanie

Za najbardziej przydatne biocydy w mikro-rozmnażaniu ziemniaka uznano: Plant Preservative Mixture (PPM™) w stężeniu 0,4-0,5%, ProClin300® 0,02-0,03% oraz podchloryn sodu (NaClO) 0,001%. Jednocześnie należy sprawdzić trwałość efektu zastosowanych preparatów na dalszych etapach mikrorozmnażania.

Wykazano, że CitroseptOrganic i azotan srebra (AgNO₃) należy wykluczyć ze stosowania w kulturach in vitro ziemniaka ze względu na fitotoksyczność i niekorzystny wpływ na rozwój pędów i korzeni mikrosadzonek ziemniaka. Z kolei brak działania bakteriobójczego preparatu Nitrofurazone eliminuje go ze stosowania jako środka do uwalniania roślin in vitro ziemniaka od bakterii endogennych.

Przeprowadzone badania wskazują, że przy stosowaniu preparatów bakteriobójczych w kulturach tkankowych konieczny jest dobór biocydu umożliwiającego namnażanie sterylnych eksplantatów, charakteryzujących się korzystnymi parametrami wzrostu i rozwoju.

Literatura

- Aust H. J. 2001.** Comparison of the colonization of monocotyledonous and Dicotyledonous Plants by endophytic fungi. Proc. 4 Int. *Neotyphodium*/Grass Interactions Symp., eds. Pau and Dapprich: 9-16;
- 2. 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;
- 3. Falkiner F. R. 1997.** Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation. [W:] Pathogen and Microbial contamination Management in Micropropagation" (A. C. Cassels, ed.). Kluwer

- Acad. Publ.: 155-161; **4. 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; **5. Klama J. 2004.** Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. Pr. przegl. – Acta Sci. Pol., Agricultura 3(1): 19-28; **6. Kubota C., Tadokoro N. 1999.** In Vitro Cell. – Dev. Biol.-Plant. 35: 296-298; **7. Malepszy S. 2001.** Biotechnologia roślin. Pr. zbior. pod red. S. Malepszego. Wyd. Nauk. PWN Warszawa: 30-32; **8. Orlikowska T., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkteler E. 2010.** Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro. Pr. przegl. – Biotechnologia 2(89): 57-71; **9. Orlikowska T., Zawadzka M. 2006.** Bakterie w kulturach tkanek roślinnych in vitro. Pr. przegl. – Biotechnologia 4(75): 64-77; **10. Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012.** Influence of the biocides PPM and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. – J. Hortic. Sci. Biotech. 87. 3: 223-230; **11. Pirttilä A. M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. 2000.** Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. – Appl. Environ. Microbiol. 66: 3073-3077; **12. 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; **13. 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 microshoots and the quality of artificial seed produced. – Sci. Hortic. 141: 47-52; **14. Wilson D. 1995.** Endophyte-the evolution of a term and clarification of its use and definition. – Oikos 73: 274-276

