

ELIMINACJA ZANIECZYSZCZEŃ BAKTERYJNYCH W KULTURACH IN VITRO ZIEMNIAKA

inż. Danuta Sekrecka, mgr inż. Dorota Michałowska

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiała w Boninie

e-mail: sekrecka@ziemniak-bonin.pl

Nawet największa staranność w procedurze mikrorozmnażania roślin nie daje pewności utrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Zauważono, że na etapie inicjacji kultury można wprowadzić bakterie endogenne zasiedlające tkanki roślinne, które mogą ujawnić się dopiero po wielu miesiącach pasażowania (Orlikowska 2010). Obecność bakterii, czy to patogenicznych, czy niepatogenicznych, a nawet pożytecznych, jest w kulturach in vitro niepożądana. Szczególnie ważne jest to w kulturach wieloletnich, które stanowią podstawę w bankach genów in vitro. Dlatego należy szukać różnych rozwiązań, aby po pierwsze, nie wprowadzać bakterii z eksplantatem inicjalnym, a po drugie – zabezpieczać kultury przed zasiedleniem przez bakterie różnego pochodzenia (Orlikowska, Zawadzka 2006).

Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach in vitro jest zmętnienie pożywki pod eksplantatem, a także pojawiające się po kilku dniach po wyszczerpieniu wodniste „halo” wokół eksplantatu. Po raz pierwszy endofity zostały zdefiniowane przez Wilsona (1995) jako mikroorganizmy żyjące wewnątrz organizmu rośliny. Z kolei Strobel (2004) określił, że endofit (ang. endophyte) oznacza dosłownie „wewnątrz rośliny” i każda roślina jest gospodarzem dla kilku gatunków bakterii i grzybów, jednak zazwyczaj jeden lub dwa są dominujące.

W kulturach in vitro bakterie endogenne często występują w stanie utajonym w eksplantatach, powoli się namnażają i mogą się ujawnić dopiero po kilku lub kilkunastu pasażach. Dlatego tak ważne jest ograniczanie populacji tych bakterii, m.in. przez bezwzględne eliminowanie kultur zasiedlonych bakteriami patogenicznymi, częste zakładanie nowych kultur oraz stosowanie bakteriocydów i bakteriostatyków. Z kolei włączenie do pożywek związków bakteriobójczych lub bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego powinny być prowadzone badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością dla poszczególnych gatunków roślin.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły rośliny in vitro 5 odmian pozyskane z Banku Genów in vitro ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano dwa: **Plant Preservative Mixture (PPM)** i **ProClin 300**. Oba są stosowane z powodzeniem w kulturach in vitro innych roślin, brak jest natomiast informacji na temat ich wykorzystania w kulturach in vitro ziemniaka. Plant Preservative Mixture PPM, produkowany w USA (Plant Cell Technology, Inc), jest biocydem o szerokim spektrum zastosowania, polecanym w hodowli tkanek roślinnych do powszechnego stosowania. Wykorzystywany jest przeciw bakteriom i grzybom rosnącym zarówno w pożywce, jak i w zanieczyszczonych tkankach. W zależności od dawki i stopnia zakażenia może pełnić funkcję składnika biostatycznego, a także środka zapobiegawczego. ProClin 300 to biocyd oraz konserwant do odczynników stosowanych w diagnostyce in vitro. Przedstawiany jest jako wysoce efektywny biocyd z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności, a także niskiej toksyczności. Nie wykazywał fitotoksyczności dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty (Orlikowska i in. 2010).

Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczano pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem tiaminy, kwasu nikotynowego, pirydoksyny, glicyny, myo-inozytolu, hydrolizatu kazeiny, sacharozy i agaru. Odczyn pH pożywki ustalono na poziomie 5,8, poddano sterylizacji parą wodną (121°C) przez 15 min, a następnie za pomocą filtrów strzykawkowych dodano ustalone dawki preparatów. Preparaty dodano do pożywki MS w dawkach zalecanych przez producenta w 3 stężeniach: PPM 0,05; 0,125 i 0,2%, ProClin 300 – 0,02; 0,05 i 0,07%.

Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono przez 4 tygodnie w fitotronie w temperaturze 20-18°C, przy 16-godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8 W.m². Pierwsze obserwacje kultur wykonano po 3 dniach od wyszczerpienia eksplantatów. Obecność bakterii oceniano na podstawie pojawiającego się zmętnienia pożywki pod eksplantatem. Następnie co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tj. stopień ukorzenia, wysokość roślin i współczynnik rozmnażania.

WYNIKI

Reakcja badanych genotypów na zastosowane w pożywce biocydy była zróżnicowana. Eksplantaty wyszczerpięte na pożywkę z PPM ładnie rosły i dobrze się korzeniły. W 4. tygodniu utrzymywania kultur osiągały ok. 8-10 cm, a współczynnik rozmnażania, w zależności od genotypu, kształtował się od 5 do 9. Preparat PPM w dawce 0,2% dosyć skutecznie (79-92%) wyeliminował bakterie w kulturach *in vitro*. Przy niższych dawkach PPM eliminacja bakterii endogennych była słabsza i wynosiła 15-80%. Jednocześnie nie zaobserwowano reakcji fitotoksycznej na zastosowany preparat.

Z kolei eksplantaty wyłożone na pożywkę z ProClin300 już na 2-3. dzień zamierały. W miejscu zetknięcia eksplantatu z pożywką następowało bielenie łodygi i powolne jego zamieranie. Tylko przy najniższej dawce ProClin300 część eksplantatów rosła, ale rośliny były słabsze od kontrolnych. W wyższych dawkach (0,05 i 0,07%) ProClin300 wykazał silną fitotoksyczność w stosunku do ziemniaka. Preparat ProClin300 bardzo skutecznie, prawie w 100%, wyeliminował bakterie endogenne, niszcząc jednocześnie wyszczerpięte eksplantaty. Preparat został wybrany do doświadczenia, gdyż w badaniach dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty nie był toksyczny i był wg Orlikowskiej i innych (2010) bardzo obiecujący. W stosunku do roślin ziemniaka, w zastosowanych dawkach, okazał się fitotoksyczny i w kolejnych latach zostaną przebadane niższe dawki tego biocydu.

LITERATURA

1. Orlikowska T., Zawadzka M. 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. Pr. przeglądowa. – *Biotechnologia* 4(75): 64-76
2. Orlikowska T., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkteler E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro*. Pr. przeglądowa. – *Biotechnologia* 2(89): 57-71
3. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. – *J. Nat. Prod.* 67(2): 257-68
4. Wilson D. 1995. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. – *Oikos* 73: 274-276