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 2018 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 ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty w plonie bulw. Największe zagrożenie stanowi wirus PVY ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirus PVS i PVM ziemniaka, które łatwo się rozprzestrzeniają 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 tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001). W ramach tematu badawczego zaplanowano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów S i M ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Termoterapia

*Materiał i metody*

Bulwy dwóch odmian: Latest 16-159 porażonej wirusem PVM i Leonata z wirusem PVS 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 (zbadano czynnik osobowy) i wyizolowano średnio po 100 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 Leonata i Latest 16-159, poddanych termoterapii wyizolowano ok. 200 merystemów. Pąki kątowe zostały podzielone między dwóch wykonawców. Procent otrzymanych roślin in vitro, w tym roślin uwolnionych od wirusa jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów był zależny m.in. od wykonawcy. Z odmiany zainfekowanej wirusem PVM w zależności od wykonawcy uzyskano od 26,4% do 16% zdrowych roślin in vitro. Większy problem w uwalnianiu stwarza wirus PVS ziemniaka, dlatego izolowano w miare możliwości tylko kopułę merystematyczną. W zależności od wykonawcy uzyskano od 16,2% do 8% roślin wolnych od wirusa PVS ziemniaka.

*Dyskusja*

Przez lata wielu badaczy próbuje znaleźć idealny sposób na wyeliminowanie wirusów z roślin. Już w 1952 roku ukazały się pierwsze informacje w literaturze o tym, iż wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane merystemy mogą być od nich wolne (Morel,Martin 1952). Kolejne badania wykazały że ilość roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam i Tedesse, 2008). Jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Ali i in 2013). W tegorocznych badaniach wykazaliśmy również jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin *in vitro* ma czynnik ludzki. Z materiału poddanego tym samym warunkom termoterapii, w zależności od wykonawcy uzyskano z merystemów od 68% (wykonawca 1) do 30% (wykonawca 2) roślin in vitro, w tym wolnych od wirusa 26,4% (wykonawca 1) do 8% (wykonawca 2).

*Wnioski*

Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa PVS i PVM ziemniaka poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na co składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu.

Chemioterapia.

*Materiał i metody*

Rośliny i*n vitro* 5 genotypów: Linzer Starke, Eugenia (porażone wirusem PVS ziemniaka), TE-1, Giewont (PVM) i EF 55-8545 (PVY), poddano działaniu 2 substancji antywirusowych: rybawiryna i tiouracyl. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem rybawiryny lub tiouracylu. Pożywkę MS z ustalonym pH na poziomie 5,8 poddano sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu sterylizacji (temperatura 1210C, ciśnienie 0,2MPa i czas 15 minut). Do sterylnej pożywki, przy pomocy filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki rybawiryny (RBV) i tiouracylu (TIO). W 2018 roku dawki rybawiryny zostały zwiększone w stosunku do dawek z 2017 roku i były to 30, 40 i 50 mg/l pożywki. W miejsce stosowanej w 2017 roku azacytydyny (fitotoksyczne działanie na rośliny in vitro), w tym roku zastosowano tiouracyl w dawkach: 0,005, 0,010 i 0,015 mg/l. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczepione na pożywkę bez antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie, w temperaturze 22-200C z zachowaniem 16 godzinnego dnia i oświetleniu ok. 8 W·m2 przez okres 3-4 tygodni. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin *in vitro* tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin, ulistnienie oraz współczynnik rozmnażania (liczbę międzywęźli). W 4 tygodniu z każdej kombinacji wysadzono po 5 roślin w szklarni do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4-5 tygodniach rośliny przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Wykonano 2-krotne testy zdrowotnościowe. Doświadczenie z antymetabolitami wykonano w czterech powtórzeniach.

*Wyniki*

W 2018 roku zastosowano wyższe dawki rybawiryny, natomiast w miejsce azacytydyny (silnie fitotoksyczne działanie na rośliny in vitro), wprowadzono tiouracyl. Rybawiryna dodana do podłoża w dawce 30 i 40 mg/l nieznacznie obniżyła poziom ekstynkcji wirusa PVS i silnie obniżyła poziom PVY ziemniaka w roślinach in vitro. Jednoczesnie jej fitotoksyczne działanie na rozwój roślin in vitro było wprost proporcjonalne do stężenia. Dawka 50 mg/l miała negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin in vitro (silne fitotoksyczne działanie), rośliny były znacznie słabsze od roślin kontrolnych i nie korzeniły się, więc nie uzyskano z nich materiału do testu DAS ELISA.W eliminacji wirusa PVM ziemniaka zastosowana rybawiryna nie miała wpływu na obniżenie poziomu ekstynkcji. Z kolei dodatek do pożywki różnych dawek tiouracylu nie miał wpływu na eliminację zarówno wirusa PVS i PVM ziemniaka z badanych odmian, tylko 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 Lijie 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 również, że wyższe dawki RBV obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, ale jednocześnie działają fitotoksycznie na eksplantaty.Natomiast zastosowane dawki tiouracylu nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVS i PVM ziemniaka, jedynie zmniejszyła się koncentracja wirusa PVY ziemniaka.

*Wnioski*

Rybawiryna dodana do pożywki zmniejsza koncentrację wirusa S ziemniaka wprost proporcjonalnie do stężenia.

Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa M ziemniaka.

Rybawiryna ma wpływ na zmniejszenie koncentracji wirusa PVY ziemniaka.

Dodanie do podłoża dawki 50 mg/l rybawiryny działa fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty.

Tiouracyl dodany w badanych dawkach do pożywki nie ma wpływu na eliminację wirusa PVS i PVM ziemniaka.

Zastosowane dawki tiouracylu zmniejszyły ekstynkcję wirusa PVY ziemniaka.

Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roslin in vitro.

*Cytowana literatura*

*Ali M.A., Nasiruddin K.M., Hanque 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 status on potatoes grown in eritrea and in vitro elimination of local variety Tsaeda embaba. Afri.J.Biotech. 7(4): 397-403; *Chrzanowska M.* 2000. Choroby ziemniaka wywoływane przez wirusy. Wieś Jutra 3(20): 27-29; *Faccioli G.*2001. Control of Potato Viruses using Meristem and Stem- cutting Cultures, Thermotherapy and Chemotherapy. Ed. Virus and Virus-like Disease of Potatoes and production od Seed Potatoes. 382-385; *Kostiw M.* 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. Wieś Jutra 1 (174): 28-29; *Mahmoud 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. Warszawa 2001: 36; *Morel G., Martin C.* 1952. Guerison de dahlias attients d’une maladie a virus. C.R.Acad.Sci.235, 1324-1325; *Murashige T., Skoog F.*1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tisue culture. Physiol. Plant. 15; 473-479; *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.Phytopathol. 22b(1):63-70; *Norris D.O.* 1954. Development of virus-free stock of Green Mountain potato by treatment with malachite green. Australian J.Agricul.Res. 5, 658-663; *Oshiman N., Livingston C.H.* 1961. The effects of antiviral chemicals on potato virus X. Am.Potato J. 38: 294-299; *Zaklukiewicz K.* 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. Ziemniaka 1981/82: 137-160.

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

*Cel tematu*

Celem tematu w 2018 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych: PPM™, ProClin 300® i AgNOз, pod kątem skuteczności zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności.

Bakterie endofityczne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikrorozmnażania nie daje stuprocentowej 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 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 ujawinia się w kulturach po 3-5 dniach od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych. Na rynku dostępne są różne preparaty bakteriobójcze m.in. PPMTM, ProClin 300®, AgNOз, które w naszych badaniach sprawdzamy pod kątem ich skuteczności i fitotoksyczności.

*Materiał i metody*

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 4 odmian: Finezja, Gawin, Harpun i Michalina pozyskane z Banku Genów *in vitro*, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano trzy: Plant Preservative Mixture TM (PPM), ProClin300® i azotan srebra(Ag NOз). Preparaty te są stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych gatunków roślin, brakuje jednak informacji na temat stosowania w kulturach *in vitro* ziemniaka. **Preparat Plant Preservative MixtureTM** to mikstura, która jest biocydem o szerokim spektrum zastosowania i 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. **ProClin 300®** jest biocydem oraz konserwantem do odczynników stosowanych w diagnostyce *in vitro.* W literaturze przedstawiany jako wysoce efektywny środek z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności, a także niskiej toksyczności. Nie wykazywał fitotoksyczności dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosta. Bakteriobójczy wpływ **azotanu srebra (Ag NOз)** od lat jest znany 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 i Tadokoro 1999).

Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiono na pożywkę Murashige-Skoog’a, z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Standardowa pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, myo-inozytolu, sacharozy i zestalona agarem (0,4%) została poddana sterylizacji parą wodną (1210C) przez 15 minut, a następnie pod komorą laminarą (w warunkach sterylnych) przy pomocy filtrów strzykawkowych dodano do niej ustalone dawki preparatów. W roku sprawozdawczym zastosowano następujące dawki preparatów: PPM w stężeniach 0,0 (kontrola); 0,3; 0,4 i 0,5%, ProClin 300® w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,02; 0,03; 0,04%, a azotan srebra w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,05; 0,15 i 0,1%. Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie przez okres 4 tygodni, w temperaturze 22-200C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8W·m2. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano 3 dnia po wyszczepieniu eksplantatów. Do 7 dnia dokładnie można zaobserwować wystąpienie mgiełek, wskazujących na obecnośc 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 dla 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 4 powtórzenia.

*Wyniki*

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, a 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. Również dodatek do pożywki ProClin300® eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 100% przy zastosowaniu najwyższej dawki i w 86,67% przy zastosowaniu niższej dawki. Jednocześnie przy niższych dawkach nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin in vitro, tylko przy najwyższej dawce 0,04% rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli. Azotan srebra (AgNOз) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminacje bakterii endogennych z kultur in vitro ocenianych odmian. Dodatkowo przeszczepione fragmenty roślin in vitro zareagowały na azotan srebra, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobulwkami.

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.

*Dyskusja*

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). Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych i bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością. 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. Azotan srebra w ocenianych dawkach nie przyniósł oczekiwanych efektów, tzn. nie eliminował bakterii endogennych z kultur in vitro, a dodatkowo niekorzystnie działał na wszczepione eksplantaty – rośliny słabo korzeniły się i były niskie (1 międzywęźle) w stosunku do roślin z kontroli (6-7 międzywęźli).

*Wnioski*

Preparat PPM™ w badanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 78,35- 100% nie wykazując fitotoksycznego działania na rośliny in vitro.

Zsatosowane dawki ProClin 300® eliminowały występowanie zanieczyszczeń endogennych w 86,67-100%, tylko przy najwyższej dawce nieznacznie wpłynęły na rozwój roślin in vitro.

Azotan srebra (AgNOз) w badanych dawkach nie miał wpływu na eliminację zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka jednocześnie szkodliwie działając na wszczepione eksplantaty.

Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki PPM™ i ProClin 300® wyeliminują bakterie endogenne z kultur in vitro ziemniaka.

*Cytowana literatura*

*Chamberlain R.E.* 1976. Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. J.antimicrob.Chemother., 2, 325-332; *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; *Hail Z.Rihan, Mohammed Al.-Issawi, Fadil Al.-swedi, Michael P.Fuller.* 2012. The effects of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. Sci.Hortic.141, 47-52; *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. THE Journal of Horticultural Science & Biotechnology. Vol. 87. No:3, 223-230

*Prace opublikowane*

Michałowska D., Sekrecka D., Przewodowska A., Piskorz J. 2018.Zwalczanie zakażeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka za pomocą preparatów PPM i ProClin. Ziemniak Polski 3:43-47.

Michałowska D., Przewodowska A., Buryło P. 2018. Skuteczność stosowania rybawiryny w uwalnianiu roślin od wirusów S i M ziemniaka. Streszczenia 51. konferencji naukowo-szkoleniowej „Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka”, Dźwirzyno 6-8 czerwca 2018r.: 39-40.