

ZWALCZANIE ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH W KULTURACH IN VITRO ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ PREPARATÓW PPM I PROCLIN

COMBATING BACTERIAL INFECTIONS IN IN VITRO POTATO CULTURES USING THE PPM AND PROCLIN PREPARATIONS

mgr inż. Dorota Michałowska, inż. Danuta Sekrecka
dr inż. Agnieszka Przewodowska, mgr inż. Joanna Piskorz
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl

Streszczenie

Bakterie endogenne stanowią problem dla kultur in vitro niezależnie od gatunku rośliny. Odkazanie pożywek, naczyń laboratoryjnych oraz praca z zachowaniem rygorów sterylności powinny teoretycznie umożliwić otrzymanie sterylnych kultur tkankowych. Jednak po kilku lub kilkunastu pasażach u części kultur in vitro widoczne są zanieczyszczenia bakteryjne. Na rynku pojawiło się wiele preparatów bakteriobójczych, jak: Plant Preservation Mixture (PPM), Vitrofur, ProClin, Decaben C. Dlatego podjęto prace nad ustaleniem stężeń wybranych preparatów w odniesieniu do roślin ziemniaka w hodowli in vitro.

Słowa kluczowe: bakterie endogenne, biocydy, in vitro, preparaty bakteriobójcze, ziemniak

Abstract

Endogenous bacteria are a problem for in vitro cultures, regardless of the plant species. Disinfection of nutrient media, laboratory vessels and work with the rigors of sterility should theoretically enable to obtain sterile tissue cultures. However, after several passages, bacterial contaminants are still visible in some in vitro cultures. Many bactericidal preparations appeared on the market, such as: Plant Preservation Mixture (PPM), Vitrofur, ProClin, Decaben C. Therefore, work was undertaken to determine the concentrations of selected preparations in relation to potato plants cultured in vitro.

Keywords: bactericidal preparations, biocides, endogenous bacteria, in vitro, potato

Zjawisko występowania populacji bakterii towarzyszących roślinom wskazuje na to, że zdrowe rośliny zawierają zespoły tzw. bakterii endofitycznych. Mogą one wpływać na rośliny w różny sposób: hamować ich rozwój, stymulować lub pozostawać obojętnymi w stosunku do organizmu gospodarza. Po raz pierwszy endofity zostały zdefiniowane przez Wilsona (1995) jako mikroorganizmy żyjące wewnątrz rośliny. Z kolei Strobel (2004) dodał, że endofit (ang. endophyte) oznacza dosłownie „wewnątrz rośliny” i każda roślina jest gospodarzem dla kilku gatunków bakterii i grzybów, jednak na ogół jeden lub dwa są dominujące. Zanieczyszczenia bakteryjne 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.

Źródła zanieczyszczeń kultur in vitro zazwyczaj są trudne do określenia. Bakterie, które zanieczyszczają kultury, mogą pochodzić z eksplantatu, środowiska laboratoryjnego, być przeniesione przez roztocze, wciornastki i przedziorki lub na skutek niedokładnej sterylizacji podłoża, jak i pola pracy. Właściwie na każdym etapie mikrorozmnażania może dojść do zanieczyszczenia hodowli in vitro.

W kulturach tkankowych bakterie endogenne są najczęściej wnoszone z eksplantatem inicjalnym. Już 3-5. dnia po wszczepieniu eksplantatów na pożywkę w niektórych kulturach u ich podstawy obserwuje się nieznaczne zmętnienie podłoża tworzące „halo”. Kontrola wzrokowa pożywki oraz wszczepionych fragmentów roślin może tylko

w części wychwycić niektóre zanieczyszczenia. Dezynfekcja eksplantatów umożliwia usunięcie bakterii jedynie z ich powierzchni. Całkowite odkażenie wewnętrznych tkanek jest niemożliwe z powodu fitotoksyczności środków odkażających. Izolować należy więc jak najmniejsze eksplantaty, np. merystemy, aby uniknąć wprowadzenia bakterii do kultur in vitro. Teoretycznie bakterie te nie są szkodliwe dla mnożonych roślin, część reaguje nawet na nie pozytywnie, jednak ich obecność w kulturach roślinnych jest niepożądana. Zdarza się, że obecność bakterii wywołuje zmiany w podłożu agarowym, co może mieć negatywny wpływ na proces namnażania, m.in. na mikrotuberyzację roślin ziemniaka.

W hodowlach in vitro bakterie endogenne często występują w stanie utajonym w eksplantatach, powoli się namnażają i mogą ujawnić się dopiero po kilku lub kilkunastu pasażach. Z tego względu tak ważne jest ograniczenie populacji tych bakterii, m.in. przez bezwzględne eliminowanie kultur zasiedlonych bakteriami patogenicznymi, częste zakładanie nowych kultur oraz stosowanie bakteriocydów i bakteriostatyków. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych lub bakteriostatycznych musi być jednak bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego konieczne jest eksperymentalne ustalenie stężenia preparatu w odniesieniu do poszczególnych gatunków roślin. Na rynku dostępne są różne preparaty bakteriobójcze, m.in. PPM, ProClin, Nitrofurazone, Biosept33SI, azotan srebra, podchloryn sodu, liczne antybiotyki i olejki eteryczne. W Pracowni Zasobów Genowych i Kultur in vitro w Boninie przetestowano dwa preparaty bakteriobójcze: PPM i ProClin.

Plant Preservative Mixture to biocyd o szerokim spektrum działania, polecany w hodowli tkanek roślinnych do powszechnego stosowania. Wykorzystywany jest przeciw bakteriom i grzybom rosnącym na pożywce, a także w zanieczyszczonych tkankach. W zależności od dawki i stopnia zakażenia może pełnić funkcję składnika biostatycznego, jak również środka zapobiegawczego. PPM został przetestowany na wielu gatunkach roślin, m.in. na cytrusowych, kapustnych, melonie, petunii, tytoniu (Compton, Koch 2001).

Z kolei ProClin to biocyd oraz konserwant do odczynników stosowanych w diagnostyce in vitro. Przedstawiany jest jako wysoce efektywny środek z szerokim spektrum aktywności, o doskonałej stabilności i niskiej toksyczności. ProClin został wybrany do doświadczenia, gdyż w badaniach na eksplantatach gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty nie był toksyczny. W stosunku do roślin ziemniaka w zastosowanych dawkach okazał się jednak bardzo fitotoksyczny.

Oba środki są stosowane z powodzeniem w kulturach in vitro innych roślin, nie ma natomiast informacji na temat ich wykorzystania w kulturach in vitro ziemniaka.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny in vitro czterech odmian ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Rośliny pozyskane z banku genów in vitro były 3-krotnie pasażowane w celu osiągnięcia pożądanej liczby 60 sztuk z każdej odmiany. Jednowęzłowe fragmenty roślin przeszczepiono na pożywkę Murashige-Skooga (MS) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Klasyczna pożywka MS z dodatkiem witamin, hydrolizatu kazeiny, mezoinozytu i sacharozy została zestalona agarrem i poddana sterylizacji parą wodną (121°C) przez 15 min, a następnie pod komorą laminarną w sterylnych warunkach za pomocą filtrów strzykawkowych dodano do niej ustalone dawki preparatów: PPM 0,3%, 0,5% i 0,7%, a ProClin 0,01%, 0,02% i 0,03%. Dawki biocydów wybrano na podstawie zaleceń producentów oraz w oparciu o stężenia stosowane przez badaczy dla innych gatunków roślin. Kontrolę stanowiło podłoże standardowe MS bez dodatku biocydów.

Kultury in vitro utrzymywano w fitotronie przez 4 tygodnie w temperaturze 20-22°C, przy 16-godzinym dniu i oświetleniu ok. 8 W·m². Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano trzeciego dnia po wszczepieniu eksplantatów. Do siódmego dnia można było obserwować zmętnienie podłoża, wskazujące na obecność bakterii endogennych. Przez kolejne tygodnie opisywano wzrost i rozwój roślin in vitro, tj. stopień ukorzenienia, wysokość roślin i współczynnik rozmnażania oraz fitotoksyczne działanie

zastosowanych preparatów. Doświadczenie wykonano w 4 powtórzeniach, każdorazowo pasażując po 15 roślin w każdej kombinacji plus obiekt kontrolny.

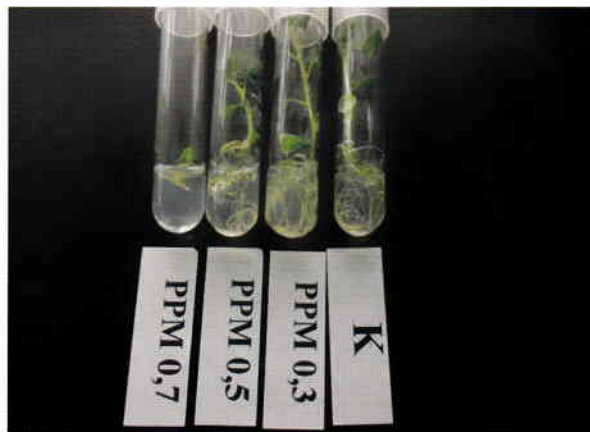
Wyniki i dyskusja

Reakcja badanych genotypów na zastosowane biocydy była zróżnicowana. Eksplantaty wszczepione na podłoże z PPM rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeniły (fot. 1).



Fot. 1. Reakcja roślin in vitro na zastosowane dawki PPM (wszystkie zdjęcia. D. Sekrecka)

Osiągnęły wysokość ok. 8-10 cm, a współczynnik rozmnażania, w zależności od genotypu, wynosił od 5 do 9 (fot. 2). Tylko najwyższa dawka (0,7%) nieznacznie wpłynęła na obniżenie do 6 cm wysokości roślin in vitro ocenianych odmian. Dodane do pożywki nawet najniższe dawki biocydu (0,3%) eliminowały zanieczyszczenia bakteryjne w 100% (tab. 1).



Fot. 2. Wpływ dodatku różnych dawek PPM na wzrost i rozwój roślin in vitro

ProClin (fot. 3) w zastosowanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne średnio w 93% kultur – zakres 82-100% (tab. 1). Jednak w wyższych dawkach (0,03%) okazał się silnie fitotoksyczny w stosunku do roślin ziemniaka in vitro (fot. 4).

W miejscu zetknięcia eksplantatu z pożywką następowało bielenie łodygi i powolne jego zamieranie. Przy niższych dawkach (0,01%) część eksplantatów rosła, lecz rośliny były słabsze od kontrolnych, które rosły na pożywce bez dodatku biocydu (fot. 5 i 6).



Fot. 3. Reakcja roślin in vitro na różne dawki ProClin



Fot. 4. Fitotoksyczny wpływ dawki 0,03% ProClin na eksplantaty ziemniaka



Fot. 5. Reakcja roślin *in vitro* na zastosowane dawki ProClin



Fot. 6. Rośliny *in vitro* bez dodatku biocydów – kontrola

Tabela 1

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

Biocyd	Dawka (%)	Odmiana 1	Odmiana 2	Odmiana 3	Odmiana 4	Średnia (%)
PPM	0,00	45,57	16,10	20,57	28,90	27,79
	0,30	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,50	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	0,70	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
ProClin	0,00	45,57	16,10	20,57	28,90	27,79
	0,01	75,57	82,23	68,90	77,77	76,12
	0,02	100,00	100,00	84,43	73,33	89,44
	0,03	100,00	95,57	95,57	82,23	93,34

Podsumowanie

Wykazano pozytywny wpływ PPM i ProClin na redukcję zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka. Jednak szczególnie ważne jest, aby preparaty bakteriobójcze stosować w odpowiedniej koncentracji, ponieważ przy wysokich stężeniach mogą być szkodliwe dla materiału roślinnego. Dlatego w celu określenia optymalnych dawek PPM i ProClin, które jednocześnie wyeliminują bakterie endogenne z pożywki i będą bezpieczne dla tkanek roślinnych, prowadzone są dalsze badania, rozszerzone o obserwację trwałości efektu bakteriobójczego biocydów w kolejnych pasażach roślin *in vitro*.

Literatura

1. 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;
2. Heggors 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;
3. Kłama J. 2004. Współzycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Pr. przegl. – Acta Sci. Pol., Agricultura* 3(1): 19-28;
4. Orlikowska T., Zawadzka M. 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. *Pr. przegl. – Biotechnologia* 4(75): 64-77;
5. Orlikowska T., Sobiszewski P., Zawadzka M., Zenkteler E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro*. *Pr. przegl. – Biotechnologia* 2(89): 57-71;
6. 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;
7. Reagor L., Gusman J., McCoy L., Carino E., Heggors 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;
8. Rihan H. Z., Al-Issawi M., Al-Swedi F., Fuller M. P. 2012. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the growth and survival of potato tubers *in vitro*. – *J. Altern. Complement. Med.* 18(1): 1-10.

tive mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. – Sci. Hortic. 141: 47-52; 9. Wilson D. 1995. Endophyte-

the evolution of a term and clarification of its use and definition. – Oikos 73, 274-276

Przechowalnictwo i przetwórstwo

WIEDZA O ZIEMNIAKU I JEGO PRZECHOWYWANIU W XIX WIEKU

POTATO KNOW-HOW AND TUBER STORAGE IN THE NINETEENTH CENTURY

prof. dr hab. inż. Antoni Golachowski, dr inż. Ewa Zdybel

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa
ul. J. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław, e-mail: antoni.golachowski@upwr.edu.pl

Streszczenie

Ziemniaki były ważnym, powszechnym i produkowanym na dużą skalę produktem rolniczym. Zdawało sobie sprawę z różnic odmianowych oraz wpływu terminu zbioru na ich jakość i skład chemiczny. Były użytkowane przez cały rok, dlatego problem właściwego ich przechowywania był bardzo istotny. Poszukiwano sposobów stworzenia jak najlepszych warunków do przechowywania bulw, celem uniknięcia strat wywołanych przez przemarzanie, kiełkowanie czy porażenie chorobami. Przeciwno kiełkowaniu polecano zanurzanie bulw we wrzącej wodzie na 4 sekundy i po osuszeniu przechowywanie w piwnicach, dołach i kopcach. Wiedzano już, że wysuszone ziemniaki można łatwiej i dłużej przechowywać niż świeże, stąd opisy wytwarzania różnego rodzaju suszów. Susze przechowywano w postaci placków z wysuszonej miazgi ziemniaczanej, kostki lub „kaszy z kartofli”.

Słowa kluczowe: XIX w., sposoby przechowywania, sposoby użytkowania, ziemniak

Abstract

In the XIX century potatoes were significant, widespread and large-scale agricultural products. Both, the differences between cultivars and the impact of the harvest date on tubers quality and their chemical composition were known. Potatoes were used throughout the year, and the problem of proper storage was significant. Therefore, the best conditions for storing tubers to avoid losses caused by freezing, sprouting or diseases were sought. To prevent sprouting, it was recommended to drench the tubers in boiling water for 4 seconds and after drying store in basements, pits, and mounds. It was already known that dried potatoes could be stored easier and longer than fresh ones, hence descriptions of the production of various types of dehydrated potato wares. They were stored in the form of cakes made of dried potato pulp, cubes or as "potato groats".

Keywords: methods of use, XIX century, potato, storage methods

Ziemniaki były, są i będą ważnym produktem rolniczym, znajdującym szerokie zastosowanie w żywieniu ludzi i zwierząt oraz przetwórstwie przemysłowym ze względu na swoje walory użytkowe i pokarmowe. Już 200 lat temu, na początku XIX

wieku, opisywano ich skład chemiczny w sposób następujący:

„Kartofle są lżejszą i delikatniejszą potrawą, niż chleb, jako naydelikatniejsze materje pożywne mąki: krochmal, kley i białko znowu się w kartoflach znaydują, a przeciwnie bra-