

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW; 63

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

Kierownik zadania: inż. Danuta Sekrecka

*Cel projektu:*

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

W 2017 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, M i Y 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 Y ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirus S i M 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. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli 2001). W ramach tematu badawczego zaplanowano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów S, M i Y ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

*Material i metody*

**Termoterapia.** Bulwy dwóch odmian: Impresja porażona wirusem S ziemniaka oraz Alegria z wirusem M ziemniaka wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w fitotronie. Przez okres 4-5 tygodni rośliny poddane zostały działaniu wysokiej temperatury: 37/33°C (dzień/noc), przy oświetleniu ok. 10 W.m<sup>2</sup> 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 2-3 wykonawców (zbadano czynnik osobowy) i wyizolowano ponad 200 merystemów. Przed izolacją merystemów materiał roślinny sterylizowano w 70% etanolu przez 20 sekund, a następnie w 1,5% roztworze chloraminy przez 15 minut. Kolejną czynnością to 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 pożywkę MS (Murashige, Skoog, 1962) zestalanej agarą (0,4%), z dodatkiem kinetyny 0,04 mg/l i kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>) – 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 22°C oraz przez 8 godzin w ciemności w temperaturze 20°C.

**Chemioterapia.** Rośliny *in vitro* 5 genotypów (Eugenia i Linzer Starke (PVS), Giewont i TE-1 (PVM) oraz EF 55-8545 (PVY), w których testem DAS ELISA stwierdzono wysokie porażenie wirusami, poddano działaniu 2 substancji antywirusowych (rybawiryna-RBV i azacytydyna-AZA). Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2-3 ml pożywki MS z dodatkiem antymetabolitów. Pożywkę MS z ustalonym pH na poziomie 5,8 poddano sterylizacji w autoklawie z zachowaniem parametrów procesu tj. temperatura 121°C, ciśnienie 0,2MPa i czas 15 minut. Do sterylnej pożywki, przy pomocy filtrów strzykawkowych, pod komorą laminarną, dodano ustalone dawki rybawiryny (RBV) i azacytydyny (AZA). W roku 2017 dawki rybawiryny zostały zwiększone w stosunku do dawek z 2016 roku a w miejsce zieleni malachitowej zastosowano azacytydynę. I tak RBV jak i AZA dodano w ilości 20, 30 i 40 mg/l pożywki. Kontrolę stanowiły fragmenty roślin wyszczepione na pożywkę bez antymetabolitów. Wszystkie kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie, w temperaturze 22-20°C z zachowaniem 16 godzinnego dnia i oświetleniu ok. 8 W.m<sup>2</sup> 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 międzywęzli). W 4. tygodniu z każdej kombinacji wysadzono rośliny w szklarni

do doniczek z substratem torfowym. Po kolejnych 4-5 tygodniach rośliny przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów. Doświadczenie z antymetabolitami wykonano w czterech powtórzeniach. Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie. Istotność różnic oceniono za pomocą testu Tukey'a przy  $p=0,05$

#### Wyniki

Z genotypów Impresja i Alegria, poddanych termoterapii wyizolowano 212 merystemów. Pąki kątowe zostały podzielone pomiędzy 3 wykonawców. Procent roślin *in vitro*, w tym roślin uwolnionych od wirusa, jaki uzyskano z wyizolowanych merystemów był zależny w dużym stopniu od wykonawcy. Z genotypu zainfekowanego wirusem M ziemniaka uzyskano od 60% (wyk.1) do 26,7% (wyk. 2) roślin *in vitro* uwolnionych od tego wirusa. Większy problem w uwalnianiu stwarza wirus S ziemniaka. Czynniki osobowe miały w tym przypadku duży wpływ na uzyskanie roślin wolnych od wirusa. Izolowano w miarę możliwości tylko kopułę merystematyczną, stąd tak niski procent roślin *in vitro* (43,3 % wyk.1; 25,2% wyk.2). Wykonano 3-krotną termoterapię połączoną z izolacją merystemów i dopiero po trzeciej termoterapii (minibulwy otrzymane z roślin *in vitro*) uzyskano rośliny wolne od wirusa S ziemniaka (13,3% - wyk.1; 1,9% - (wyk. 2)

W roku sprawozdawczym zastosowano wyższe dawki rybawiryny, natomiast w miejsce zieleni malachitowej (brak efektów w latach 2015-2016) wprowadzono azacytydynę. Rybawiryna w dawce 30 i 40 mg/l pożywki miała wpływ na obniżenie poziomu ekstynkcji wirusa S i Y ziemniaka w roślinach *in vitro*. Z kolei azacytydyna tylko w wyższych dawkach miała wpływ na eliminację wirusa Y ziemniaka i uzyskano 20% zdrowych roślin przy dawce 30mg/l oraz 75% przy dawce 40mg/l. W przypadku wirusa M ziemniaka, zarówno rybawiryna jak i azacytydyna nie miały wpływu na jego eliminację. Z kolei wyższe dawki antymetabolitów miały negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Większość wyszczepionych fragmentów nie korzeniła się i nie rosła, tworzyła jedynie nieliczne mikrobulwki. Przeprowadzona analiza wariancji danych z doświadczeń pojedynczych, 2-czynnikowych w układzie całkowicie losowym wykazała istotne różnice w teście Tukey'a ( $p=0,05$ ) zarówno dla dawek antymetabolitów jak i dla genotypów.

#### 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). Merystemy nie mają połączenia z systemem naczyniowym rośliny, za pomocą którego rozprzestrzeniają się wirusy. Dlatego też po ich wypreparowaniu otrzymuje się eksplantaty o najniższej koncentracji patogenów (Panattoni 2013). Staranność w izolacji merystemów przeprowadzona przez wykonawców wpływa na uzyskane wyniki. Im mniejszy wyizolowany merystem i pozbawiony systemu naczyniowego tym większe prawdopodobieństwo uzyskania roślin zdrowych. Tegoroczne badania potwierdziły 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 93,3% do 25,2% roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa od 60% (wyk.1) do 1,9% (wyk.2).

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). Norris (1954) oraz Oshima i Livingstone (1961) zaobserwowali, że po zastosowaniu zieleni malachitowej zmniejsza się koncentracja wirusa X ziemniaka. Z kolei Nasir i in. (2010) oraz Mahmoud i in. (2009) uważają iż rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, natomiast azacytydyna w połączeniu z kulturą merystemów i termoterapią skutecznie eliminuje (do 80%) wirus X i liściozwoju ziemniaka. Stosowanie antymetabolitów ma również wady, gdyż wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywce następuje 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 ponowną ocenę skuteczności rybawiryny w eliminacji wirusów z roślin ziemniaka. W swoich badaniach zastosowali bardzo wysokie dawki RBV (75-200mg/l) i udowodnili skuteczność rybawiryny w eliminacji wirusów

z roślin ziemniaka. Jednocześnie potwierdzili że wysokie dawki działają fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty. Nasze badanie również potwierdziły iż dawki od 40 mg/l rybawiryny mają negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Z kolei azacytydyna nawet przy najniższej zastosowanej dawce miała fitotoksyczne działanie na wyszczepione fragmenty roślin nie eliminując jednocześnie wirusa S i M ziemniaka

#### Wnioski

Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa S ziemniaka podanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy, na który składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu. Rybawiryna dodana do pożywki zmniejsza koncentrację wirusa S i Y ziemniaka wprost proporcjonalnie do stężenia. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie ekstynkcji wirusa M ziemniaka. Azacytydyna nie ma wpływu na eliminację wirusa S i M ziemniaka. W wyższych dawkach AZA eliminuje wirus Y z zainfekowanych roślin *in vitro*. Rybawiryna i azacytydyna w wyższych dawkach działają fitotoksycznie na wszczepione eksplantaty.

#### 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.Agric. 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 of Seed Potatoes. 382-385; Kostiń M. 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasiennej ziemniaka. Wieś Jutra 1 (174): 28-29; Lijie Yang, Bihua N., Jun Liu, Botao Song.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.Potato Res. 91; 304-311. Mahmoud S.Y.M., Hosseiny 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. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R.Acad.Sci.235, 1324-1325; Murashige T., Skoog F.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue 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 2017 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych 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. I 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 ujawnia się w kulturach 3-5 dnia od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych. Na rynku dostępne są różne preparaty bakteriobójcze m.in. PPM<sup>TM</sup>, ProClin 300® i inne, które w naszych badaniach sprawdzamy pod kątem ich skuteczności i fitotoksyczności.

### Material i metody

Materiał badawczy stanowiły rośliny *in vitro* 4 odmian ziemniaka: Sonda, Pasja Pomorska, Zebra i Gwiazda pozyskane z Banku Genów *in vitro*, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano trzy: Plant Preservative Mixture<sup>TM</sup> (PPM), ProClin300® i ekstrakt z pestek grejpfruta (GSE)- CitroseptOrganic. 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 Mixture<sup>TM</sup>** 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. **Ekstrakt z pestek grejpfruta (GSE)** w roku 1997 stał się popularny jako suplement, środek bakteriobójczy, grzybobójczy i naturalny konserwant. Obecnie prowadzone są w różnych krajach (Francja, Stany Zjednoczone, Kanada, Niemcy i Korea) badania nad właściwościami fizycznymi, chemicznymi i nad możliwością zastosowania go w profilaktyce i terapii. M.in. wg badań opublikowanych w 2002 roku (Hegggers JP i in. 2002; Reagor L i in. 2002) GSE wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec wielu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w stosunku 1:512 rozcieńczeniu. 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 (121°C) przez 15 minut, a następnie pod komorą laminarną (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; 0,5 i 0,7%, ProClin 300® w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,01; 0,02; 0,03% a GSE (CitroseptOrganic) w stężeniach: 0,0 (kontrola); 0,2; 0,3 i 0,4% . Kultury *in vitro* utrzymywano w fitotronie przez okres 4 tygodni, w temperaturze 22-20°C, przy 16 godzinnym dniu i oświetleniu ok. 8W.m<sup>2</sup>. Pierwszą obserwację kultur każdej serii wykonywano 3 dnia po wyszczepieniu 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 dla każdej kombinacji oraz kontrolę (4 odmiany x 9 pożywek + kontrola x 4 powtórzenia =2720 testów). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie przy pomocy analizy wariancji danych z doświadczenia pojedynczego 2-czynnikowego w układzie całkowicie losowym. Istotność różnic oceniono za pomocą testu Tukey'a przy p=0,05.

### Wyniki

W zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do pożywki preparat PPM<sup>TM</sup>, podobnie jak w latach poprzednich, nie wykazał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty a nawet najniższe dawki (0,3%) eliminowały bakterie endogenne w 100%. Z kolei ProClin 300® w zastosowanych dawkach eliminował zanieczyszczenia bakteryjne średnio w 93% kultur (zakres 82,0-100,0%). Wyższe dawki to jednak negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin *in vitro* ziemniaka. CitroseptOrganic (GSE) w ocenianych dawkach eliminował zanieczyszczenia średnio w 56% kultur (zakres 40,0-64,0%). Wyszczepione fragmenty roślin *in vitro* negatywnie zareagowały na ekstrakt z pestek grejpfruta (GSE) tworząc słabo ukorzenione roślinki. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy biocydami jak i zastosowanymi dawkami.

### Dyskusja

Biocyd PPM<sup>TM</sup> został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, petunia, tytoń (Compton,Koch 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ PPM w ograniczaniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę iż 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). Orlikowska i in (2012) wykazali że PPM i Vitrofurale dodane do pożywki ograniczają wzrost bakterii na okres od 1 do 21 dni, zależnie od rodzaju bakterii, rodzaju i stężenia biocydu. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych lub

bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego tak ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością. W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM i ProClin na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka, CitroseptOrganic (GSE) z kolei, w zależności od dawki i genotypu, w różnym stopniu eliminował bakterie endogenne wpływając jednocześnie na słaby wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

#### Wnioski

Preparat PPM<sup>TM</sup> w badanych dawkach ograniczył zanieczyszczenia bakteryjne w 100%. Niższe dawki ProClin 300® nie wykazały objawów fitotoksycznych, ale jednocześnie ograniczyły zanieczyszczenia bakteryjne do 70%. CitroseptOrganic (GSE) w dawce 0,2% eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 40%. Wyższe dawki GSE to ok. 60% czystych kultur *in vitro*, ale znacznie słabsze rośliny - fitotoksyczna reakcja. Profilaktycznie zaleca się dodawanie do pożywek 0,05% preparatu PPM.

#### 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; Heggers JP., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao JG. 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. 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. THE Journal of Horticultural Science & Biotechnology. Vol. 87. No:3, 223-230; Reagor L., Gusman J., McCoy L., Carino E., Heggers JP. 2002. The effectiveness of processed grapefruit seed extract as an antibacterial agent: I. An *in vitro* agar assay. J. Altern Complement Med. 2002 Jun; 8(3); 325-32

#### Prace opublikowane

Downar-Zapolska J., Sekrecka D. 2017. Metody eliminowania wirusów z roślin ziemniaka-przegląd literatury. Ziemniak Polski 3/2017, 24-31; Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka. Mat. konf. 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7-9.06.2017r., 65; Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Termoterapia-skuteczność metody w uwalnianiu roślin od wirusa S ziemniaka. Mat. konf. 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7-9.06.2017r., 63-64.