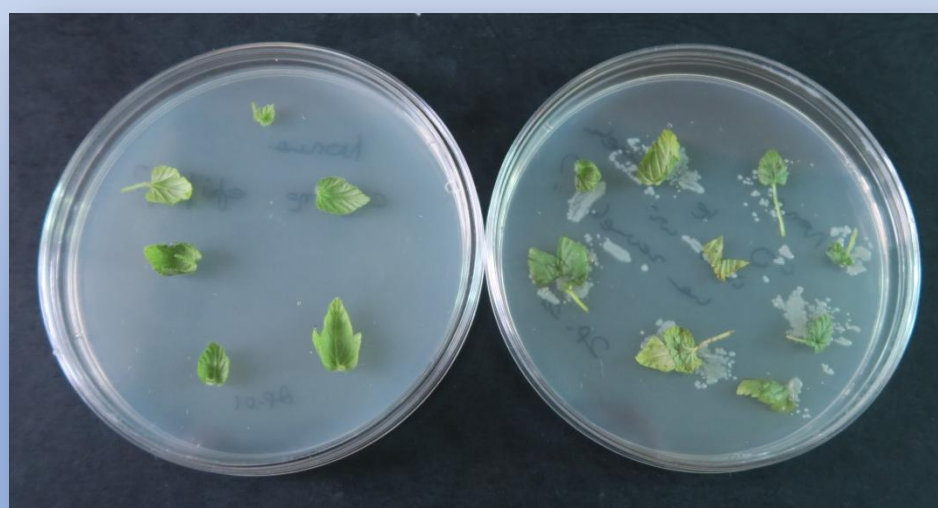


Ograniczanie zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych in vitro



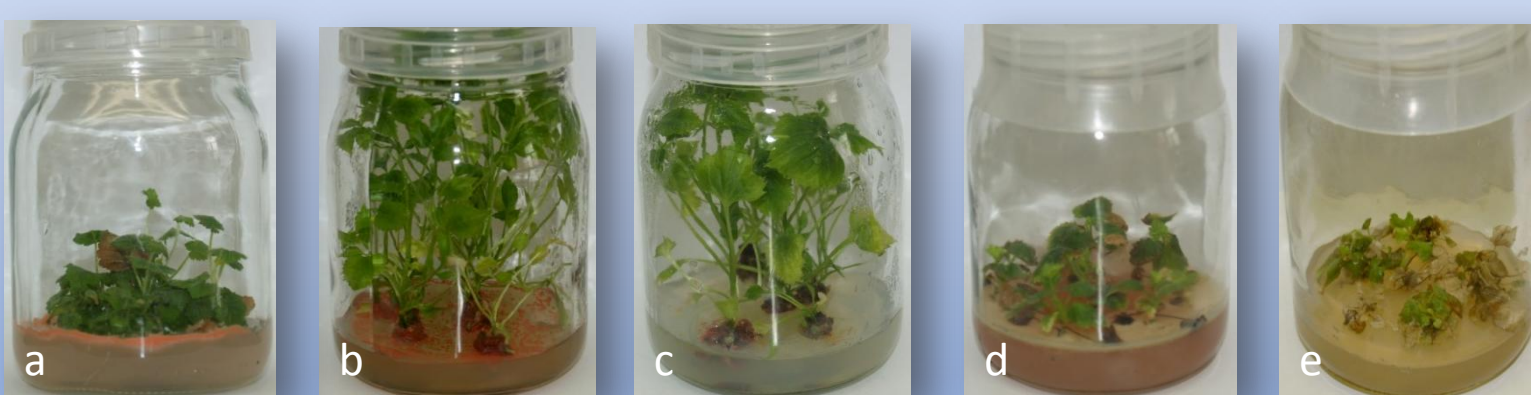
K. Nowak, A. Trzewik, E. Gabryszewska, I. Sowik, K. Górecka, T. Orlikowska
Instytut Ogrodnictwa, 96-100 Skierniewice, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3

Bakterie żyją na powierzchni roślin, w przestrzeniach międzykomórkowych i w komórkach. Powierzchniowe odkażanie eksplantatów inicjalnych nie zapewnia wyniszczenia bakterii endogennych, a więc każdy eksplantat wprowadzony do kultur jest zanieczyszczony bakteriami.

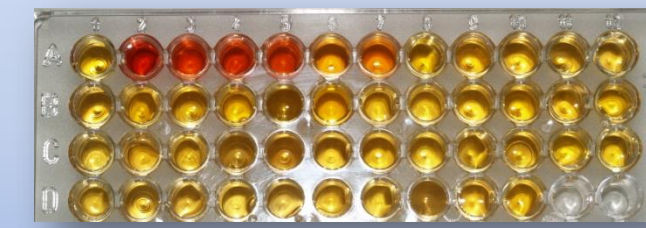


Fot. 1. Brak wzrostu bakterii epifitycznych oraz wzrost endofitycznych z liści maliny sterylizowanych powierzchniowo na pożywce NA – z lewej liście nienacinane, z prawej liście nacinane wzdłuż nerwu

Nie wszystkie bakterie upośledzają morfogenezę lub rozmnażanie, więc ich radykalne wyniszczenie nie jest konieczne. Istnieje też grupa bakterii wykazujących dobroczynny wpływ na wzrost rośliny (tzw. PGPR; *plant growth promoting bacteria*)



Fot. 2. Wpływ różnych szczepów bakteryjnych na kondycję maliny: a. neutralny, b-c. dobroczynny, d-e. szkodliwy



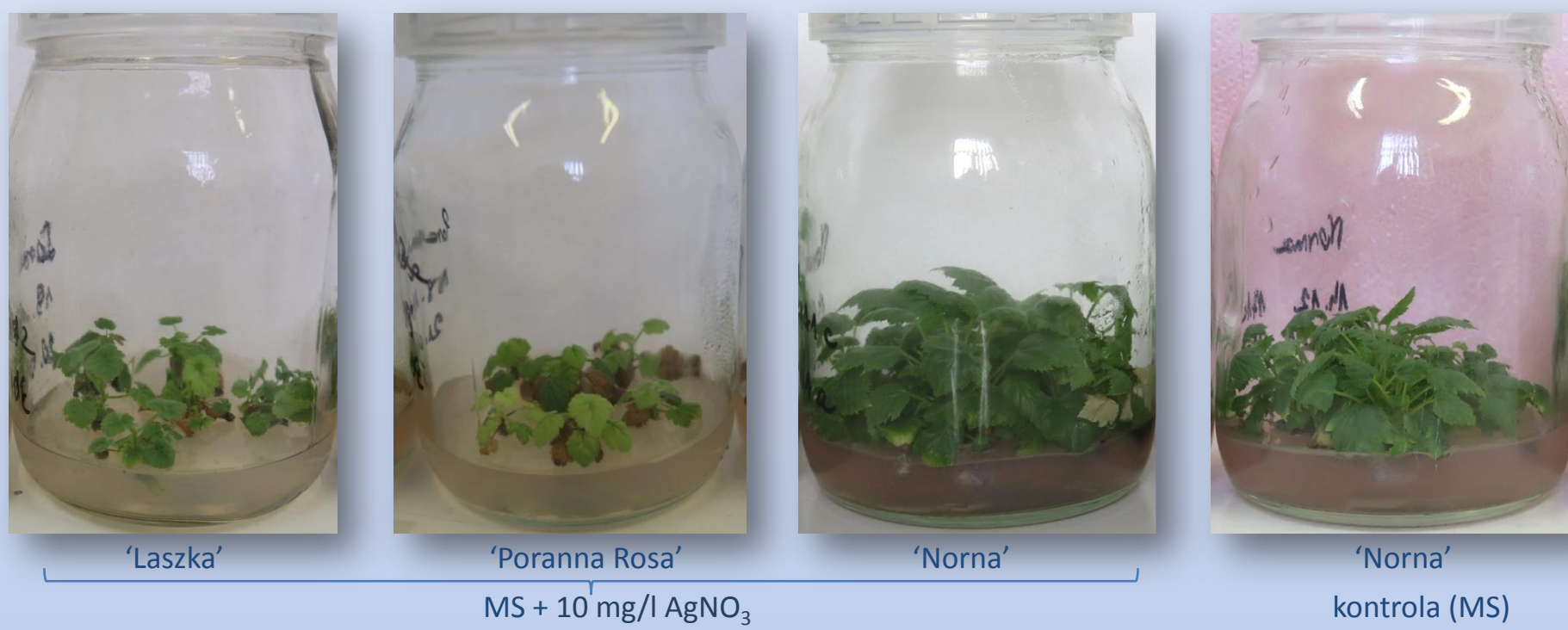
Fot. 3. Test na wytwarzanie IAA przez bakterie endofityczne

W zależności od rodzaju interakcji **bakteria-roślina**, bakterie mogą namnażać się masowo na różnym etapie kultury

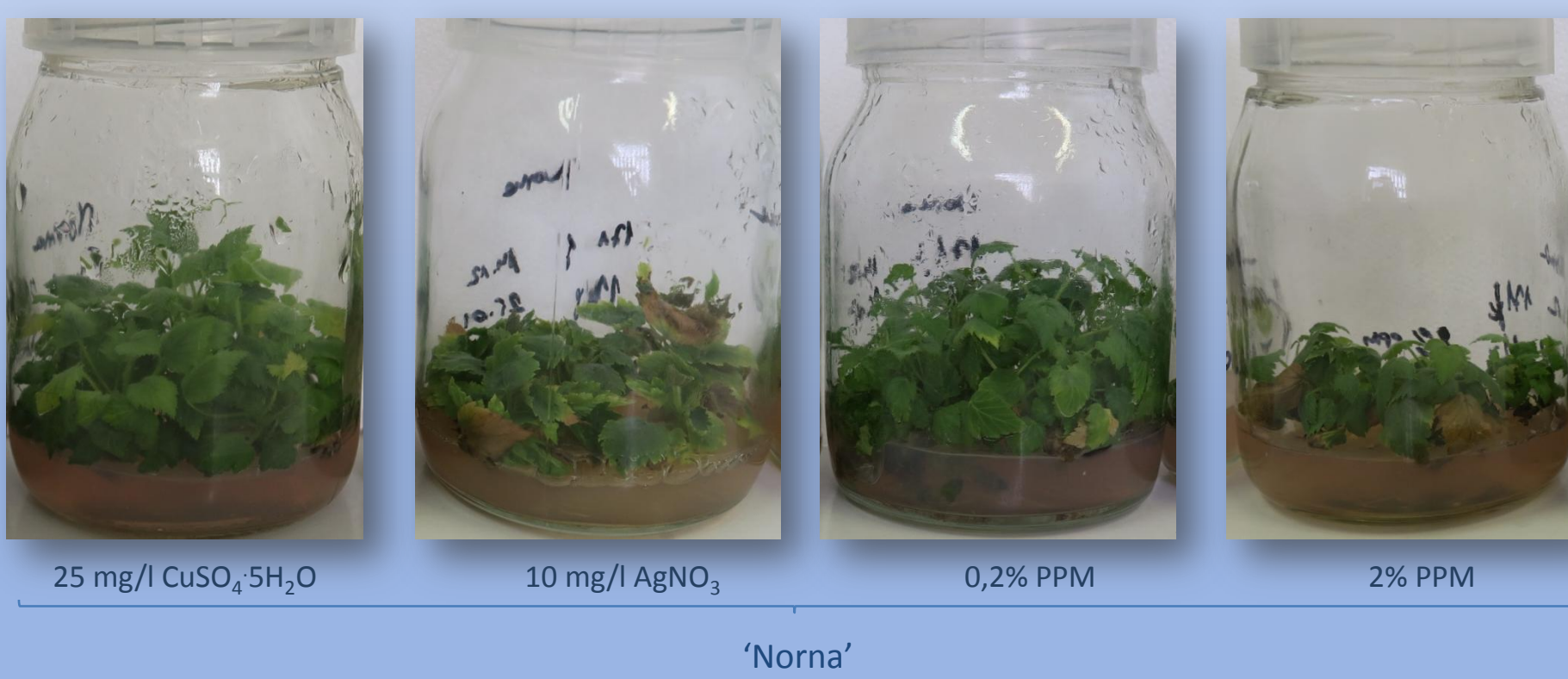
ograniczanie bakterii w zależności od stadium kultur in vitro

etap inicjalny	etap stabilizacji kultur i namnażania
Fot. 4. Zanieczyszczone kultury na etapie: z lewej - inicjalnym, z prawej - stabilizacji i namnażania	
usuwanie eksplantatów z objawami zanieczyszczenia	stosowanie biocydów szerokiego spektrum lub wyselekcjonowanych w wyniku antybiogramów
Fot. 5. Zamieranie zanieczyszczonych kultur na różnych etapach inicjacji kultur in vitro	Fot. 6. Antybiogramy dla poszczególnych izolatów bakteryjnych występujących w kulturach in vitro

Oprócz stwierdzenia wrażliwości bakterii na czynnik bakteriobójczy lub bakteriostatyczny, należy przebadać fitotoksyczność w odniesieniu do konkretnych genotypów roślinnych, ponieważ odmiany jednego gatunku reagują różnie na biocydy.



Fot. 7. Reakcja kultur pędowych maliny na obecność 10 mg/l AgNO₃ w pożywce, kontrola 'bez AgNO₃' (po 6 tygodniach)



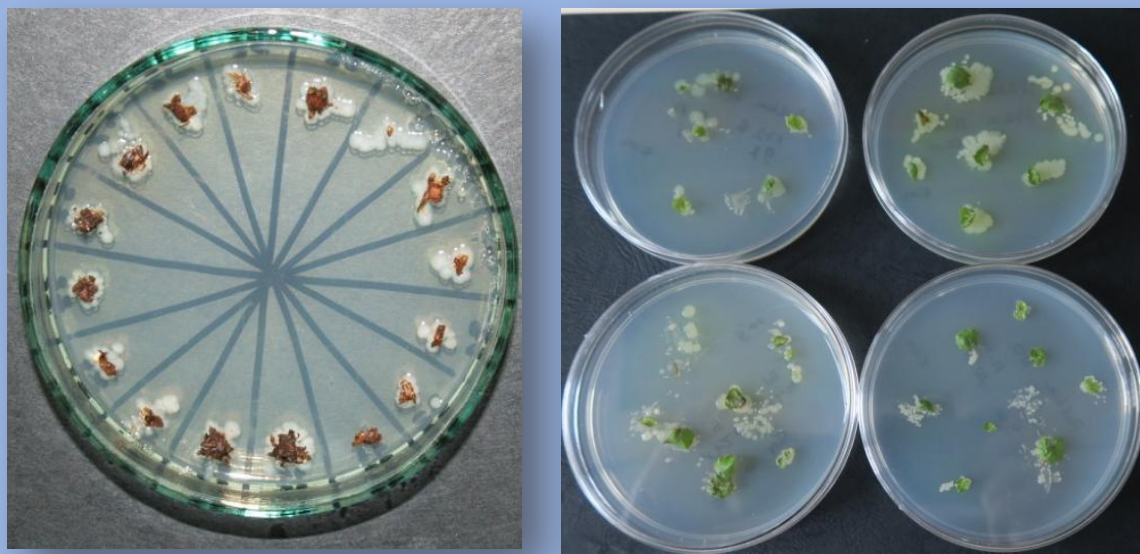
Fot. 8. Reakcja kultur pędowych maliny 'Norna' na obecność substancji przeciwbakteryjnych w pożywce. Kontrola powyżej.

W ramach realizacji Zadania 1.5 Programu Wieloletniego IO 2015-2020 „System oceny jakości, zdrowotności, czystości odmianowej i tożsamości genetycznej roślin ogrodniczych rozmnażanych metodą *in vitro*” w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach prowadzone są badania na **truskawce** (*Fragaria × ananassa* Duch.) - odm. 'Grandarosa' i 'Selva', **malinie** (*Rubus idaeus* L.) - odm. 'Polka' i 'Polana', **jagodzie kamczackiej** (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest) - odm. 'Wojtek' i 'Zojka' oraz **czosnku pospolitym** (*Alium sativum* L.) - odm. 'Ornak' i 'Jarus'

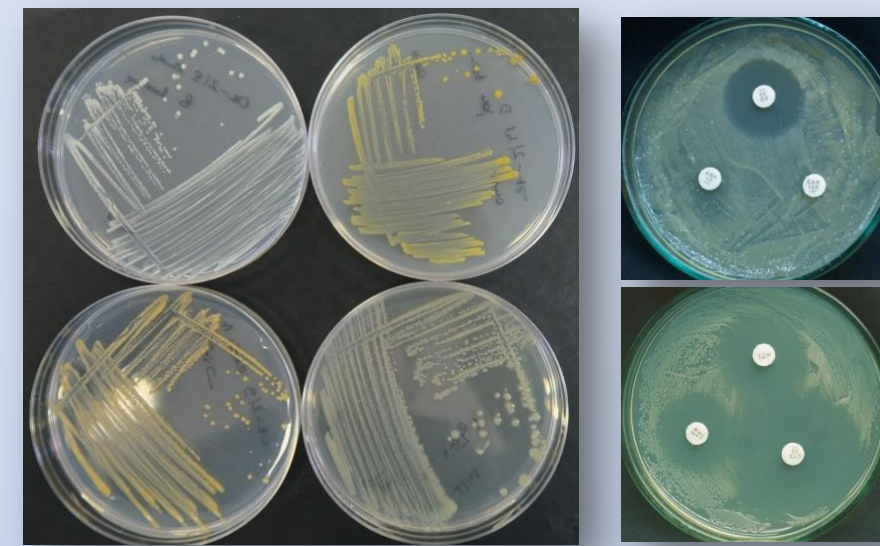
1. sterylizację powierzchniową prowadzono metodami:

Gatunek Odmiana	Rodzaj i liczba eksplantatów inicjalnych (liczba)	Metody i środki stosowane do odkażenia eksplantatów wyjściowych
Malina 'Polka' 'Polana'	Pąki wierzchołkowe i boczne pędów z uprawy polowej (385)	a/ Płukanie w wodzie bieżącej (2h), wytrząsanie w roztworze detergentu (5 min) b/ 70% etanolu (kilka sekund) c/ 0,1% HgCl ₂ (3 min) lub 2% roztworze PGM (5 min) d/ Trzykrotne płukanie w wodzie sterylnej po 5 min
Truskawka 'Grandarosa' 'Selva'	Pąki wierzchołkowe rozłogów (82)	a/ Płukanie pod bieżącą wodą (2h) b/ 70% etanolu (30 s) c/ 15% Clorox (z dodatkiem Tween) d/ 3-krotne płukanie fragm. roślin w sterylnej wodzie (10 min) Materiał roślinny pobrany z pola był sterylizowany w 0,1% roztworze HgCl ₂
Jagoda kamczacka 'Zojka' 'Wojtek'	Pąki wierzchołkowe i/lub boczne pędów z roślin ze szklarni (126)	a/ Ace (5 ml Ace/100 sterylnej wody destylowanej) przez okres 20 min. (wytrząsarka - 90 obr./min) b/ 0,1% roztworze HgCl ₂ (kilka sekund)
Czosnek pospolity 'Ornak' 'Jarus'	Fragmenty łusek z merystemem i częścią piętki (74)	3 metody odkażenia eksplantatów: I/ 2 godziny w wodnym roztworze 5% PPM, 3 krotne płukanie w wodzie sterylnej II/ 10 min w 5% CaClO ₂ (z dodatkiem Tween 20), 3 krotne płukanie sterylną wodą III/ 2 min traktowania 70% etanolem, a następnie postępowanie jak w drugiej metodzie

2. Obecność bakterii w tkankach testowano poprzez wykładanie fragmentów roślinnych na pożywki bakteriologiczne



3. Uzyskane izolaty bakteryjne charakteryzowano pod względem morfologicznym i oporności na substancje przeciwbakteryjne



Wyniki

Liczba uzyskanych pąków/pędów ocenionych wstępnie jako wolne od bakterii, testowanych na pożywkach mikrobiologicznych oraz liczba izolatów bakterii uzyskanych i poddanych testom na oporność na antybiotyki

badana roślina	liczba eksplantatów				liczba testowanych izolatów bakteryjnych
	uzyskanych	testowanych	zanieczyszczonych	z niewykrytą obecnością bakterii	
czosnek	56	56	19	37	28
jagoda kamczacka	78	78	7	65	4
malina	9	9	4	5	4

Ocena wrażliwości bakterii pochodzących ze stabilizowanych kultur jagody kamczackiej, czosnku i maliny na antybiotyki

źródło izolatu	liczba testowanych szczepów	liczba izolatów wrażliwych na antybiotyki											
		AMP 25	CTX 30	C 30	DO 30	E 30	CN 30	K 30	CAR 100	N 30	RD 30	S 10	TE 30
czosnek	28	18	1	15	21	15	21	23	0	nb	2	0	18
malina	4	3	3	0	4*	3	4*	3	3	3	4*	3	0
jagoda kamczacka	7	6	4	6	6	5	7	6	7	7	7	6	7

* wymagane jest wyższe stężenie antybiotyku

