



Znaczenie prekultur w mikrorozmnażaniu roślin zasiedlonych przez endofity

Elżbieta Zenkteler

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

The importance of precultures for micropropagation of explants containing endophytes

Summary

An endophyte is a microorganism that spends most of its life cycle inter- or intra-cellularly of the host organism without causing its disease. As a result of the high frequency of endophytes in plants, it is virtually impossible to isolate tissue or cell explants free from contaminants. Consequently, preculture (i.e. "stage 0") is necessary before disinfecting and stabilisation of *in vitro* cultures, to eliminate explants that are sources of persistent contamination. Particularly dangerous are latent bacterial contaminants, which initially do not cause any symptoms and are propagated with plant material. Their presence becomes conspicuous after the passage to a sucrose-free medium or after transplantation to the soil.

This paper reviews the modern methods of treatment that are recommended or have already been widely used to control viruses, phytoplasmas, bacteria, yeast and other fungi associated with tissues of propagated plants.

Adres do korespondencji

Elżbieta Zenkteler,
Zakład Botaniki Ogólnej,
Instytut Biologii
Eksperymentalnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
al. Niepodległości 14,
61-714 Poznań.

Key words:

endophytes, precultures, micropropagation.

1. Wprowadzenie

Status endofitów przysługujący dotychczas wyspecjalizowanym grzybom mikoryzowym i bakteriom diazotroficznym rozszerzono obecnie na gatunki niesymbiotyczne, a zatem drobno-

ustroje o charakterze neutralnym oraz niepatogeniczne pasożyty. Włączono do nich nawet patogeny okresowo bezobjawowe lub latentne oraz patogeny nie wykazujące powinowactwa do aktualnego gospodarza (1-5). Endofity te, przez całe życie lub część cyklu życiowego bytują bezobjawowo wewnątrz rośliny, kolonizują przestrzenie międzykomórkowe, komory przedchowe, rzadziej komórki miększu w liściach, pędach i korzeniach, a sporadycznie naczynia ksylemu, floem i korę (4,6,7).

Obecność drobnoustrojów nie powodujących procesów chorobowych, lecz zabezpieczających rośliny przed patogenami i stresem środowiskowym, budzi zainteresowanie fitopatologów, a także specjalistów z zakresu uprawy i hodowli roślin, którzy dostrzegają możliwość ulepszenia zdrowotności roślin poprzez wprowadzanie do nich wyselekcjonowanych szczepów bakterii (8,9). Problematyka asocjacji symbiotycznych między grzybami, promieniowcami, bakteriami i roślinami od dawna frapowała hodowców. Metody sztucznego indukowania dwu-, trój- i czterocłonowych symbioz są coraz szerzej badane w aspekcie ich zastosowania aplikacyjnego w rolnictwie. W badaniach tych wykazano m.in., że w korzeniach łubinów intensywnie zasiedlonych przez różne szczepy *Rhizobium* oraz przez grzyby endomikoryzowe, występuje kompleks izoenzymów umożliwiający roślinom tolerowanie obecności endofitów w obszarze rozciągającym się poza „strefę symbiozy” (10). Sugeruje to możliwość międzykomórkowego bytowania endofitów, u wszystkich gatunków mikoryzozależnych. Fakt ten stanowi zagrożenie dla aseptyczności kultur tkankowych, zwłaszcza, że jedynie grzyby ujawnią się po wyłożeniu eksplantatów roślinnych na dowolną pożywkę stosowaną *in vitro*, natomiast wiadomo już z całą pewnością, że wiele gatunków bakterii, o specyficznych wymaganiach co do podłoża, nie utworzy kolonii na pożywkach standardowych (11).

Chociaż metoda kultur tkankowych pozwala sprostać kolejnym, nowym wyzwaniom, to jednak sprzeczność między faktami, że „nie istnieją tkanki wolne od drobnoustrojów endofitycznych” (12-15), a także, iż „tkanki zawierające drobnoustroje nie mogą prawidłowo rozwijać się na pożywce” (11,16,17) pozostaje nadal problemem do rozwiązania.

Z przyżyciowym badaniem bakterii i grzybów w wegetatywnym aspekcie infekcji wewnątrztkankowej wiążą się znaczne trudności metodyczne, spowodowane słabą ilością materiału, trudnego do zlokalizowania. Ponieważ bakterie endofityczne trudno wykryć ze względu na ograniczoną rozdzielczość mikroskopu świetlnego, dla niewielkiej liczby komórek w polu widzenia konieczne jest stosowanie mikroskopu z kontrastem fazowym lub mikroskopu elektronowego. Równie trudna jest ocena ich rozmieszczenia w roślinie bez użycia immunofluorescencji. Dlatego niezbędne jest stosowanie najnowszych metod identyfikacji, takich jak porównywanie profilów kwasów tłuszczowych – systemem MIDI, porównywanie profilów białek – SDS-PAGE, badania spektrometryczne MALDI-TOF-MS, oraz identyfikacja metodami bazującymi na PCR z zastosowaniem 16S rRNA oraz RAPD. Spośród metod wykrywania wcześniej zidentyfikowanych bakterii, na uwagę zasługują: test ELISA, amplifikacja DNA oraz FISH, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (18). Metody te, powoli

wprowadzane do kultur tkankowych, potwierdzają powszechność występowania endofitów w tkankach roślinnych (11,16,17).

2. Charakterystyka endofitów najczęściej wykrywanych w kulturach tkankowych

2.1. Wirusy latentne

Dotychczasowe obserwacje wykazały, że wirusy latentne obecne w komórkach eksplantatu nie ujawniają swojej obecności ani na pożywce, ani też w tkance roślinnej. Integrowane do genomu rośliny pozostają w ukryciu, a metod detekcji większości z nich nadal nie opracowano. Na razie możemy zakładać, że na pożywkach zawierających syntetyczne cytokiny (kinetynę, arabinozyd adeniny, 6-fenylamino-purynę, 2,6-diaminopurynę i 6-metylopurynę w dawkach $0,05-0,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$), oraz kwasy poliakrylowy, salicylowy i β -indoliloctowy będzie zachodziło hamowanie replikacji wirusów latentnych, podobnie jak to ma miejsce w przypadku wirusów patogennych (14). W zwalczaniu wirusów *in vitro* najefektywniejsza jest chemoterapia ribawiryną – Virazole (analog uracylu), 1-B-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazol-3-karboksylamid (stosowaną w pożywkach w szerokim zakresie stężeń od 5 do $100 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$). Skuteczność działania ribawiryny wzrasta po dodaniu $10-35 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ DHT [(2,4-dioksosoheksahydro-1,3,5 triazyny (16,17)].

2.2. Wspecjalizowane fitoplazmy (MLO)

Fitoplazmy (MLO) z rodzajów: *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* i *Candidatus* („Gram +”) występują w elementach łyka, u około 300 gatunków roślin należących do 98 rodzin. Te endofityczne organizmy patogeniczne, nie ujawniają się na pożywce, powodują natomiast różnorodne deformacje eksplantatów. Skuteczną eliminację fitoplazm z tkanek roślin drzewiastych zapewnia terapia antybiotykowa *in vitro* z zastosowaniem tetracykliny w stężeniu $12,5 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. W ten sposób uwolniono hortensje od fitoplazmy zielenienia kwiatostanów (HyV – *hydrangea virescence phytoplasma*) oraz od żółtaczk astrów (AsY – *aster yellow phytoplasma*) (19). Niestety, tetracykliny nie mogą być wykorzystywane w praktyce rolniczej, ponieważ powodują szybkie uodpornianie się drobnoustrojów. Alternatywną metodą zwalczania fitoplazm *in vitro* może być traktowanie tkanek roztworem polipeptydu PAP – II o stężeniu $100-260 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ w sterylnym PBS. PAP – II (*pokeweed antiviral protein*) jest białkowym inaktywatorem rybosomu – RIP, izolowanym z liści *Phytolacca americana*. Skuteczność stosowania tego inhibitora wynosi 40-50% (19).

2.3. Bakterie

Bakterie z rodzaju *Rhizobium* (*Bradyrhizobium* lub *Azorhizobium*) brodawkujące korzenie roślin motylkowatych, do niedawna uważane były za typowych przedstawicieli endofitów bakteryjnych zasiedlających organy podziemne. Obecnie wiemy już, że występują one także w brodawkach pędowych, skąd w przypadku starzenia się i dezintegracji brodawek przenikają do wyżej położonych tkanek pędu. Intensywne tworzenie brodawek przez *Rhizobium* na całej długości pędu stwierdzono np. u *Sesbania rostrata* (10). Po utracie symbiotycznego charakteru, bakterie diazotroficzne rozpoczynają pasożytniczy etap bytowania, manifestujący się symptomami w postaci plam lub smugowatości liści, lecz rzadko wywołują u gospodarza chorobę o typowym przebiegu.

Doskonalenie metod detekcji drobnoustrojów umożliwiło wykrycie innych endofitów symbiotycznych bytujących pozakorzeniowo. Ich lista systematycznie się wydłuża, obejmując np. sinice z rodzajów *Nostoc* i *Anabaena* wiążące N_2 u *Cycadales*, diazotroficzne szczepy bakterii z rodzajów *Klebsiella* czy *Beijerinckia*, a także *Azospirillum* u *Casuarina* (10). Spośród bakterii endofitycznych do najlepiej poznanych należą wiążące azot *Acetobacter diazotrophicus* oraz *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, kolonizujące metaksylem i sąsiadujące z nim lakuny w liściach *Sorghum*, *Oryza* i *Zea* (4). W pędach niektórych roślin brodawkowanych przez symbiotyczne diazotrofy z rodzaju *Frankia* (*Actinomycetes*) stwierdzono obecność bakterii „Gram+”, opornych podczas eliminowania w trakcie prekultur. Okazuje się, że promieniowce tworzą specyficzne asocjacje aż ze 164 gatunkami roślin różnych stref klimatycznych i różnorodnych ekosystemów. Nawiązanie aktynorizy np. w tundrze przez *Dryas*, w lasach bagiennych przez *Alnus*, na wydmach nadmorskich przez *Hippophae*, *Myrica* czy *Eleagnus*, umożliwia roślinom wegetację w glebach silnie zerodowanych, lub zdegradowanych oraz zapewnia wiązanie w warunkach ekstremalnego niedoboru azotu około 40-350 kg/ha tego pierwiastka w ciągu roku (5).

U epifitycznej *Tillandsia recurvata* z *Bromeliaceae*, tolerującej skrajnie niski poziom dostawy składników mineralnych, stwierdzono obecność endogennej bakterii *Pseudomonas stutzeri* wiążącej azot (20). Rzuca to nowe światło na przyczyny powodujące trudności z wprowadzeniem bromelii do sterylnej kultury.

Bakterie niepatogeniczne są najczęstszymi przedstawicielami endofitycznej mikroflory. Ich populacja może osiągać nawet 10^7 cfu (*colony forming units*) w 1g tkanki, nie powodując równocześnie objawów chorobowych u donora eksplantatów (7,21). O endofitycznych bakteriach „Gram-”, wiemy nadal zbyt mało, mimo powszechności ich występowania i znaczącej roli jaką pełnią w życiu roślin, stymulując mechanizmy odpornościowe, a także zwiększając tolerancję na niskie temperatury (np. przymrozki) oraz na suszę (22,23). W ostatnim dziesięcioleciu powstały nowe dane o stymulującym wpływie szczepów bakteryjnych PGPB (*plant growth promoting bacteria*) z rodzaju *Pseudomonas* (a zwłaszcza wyselekcjonowanego szczepu Ps JN), na wzrost i rozgałęzianie się systemu korzeniowego oraz rozwój pędów u ziemniaka,

pomidora i tytoniu, a także na uodpornienie roślin uzyskanych w kulturach tkankowych przeciw *Phytophthora infestans* i *Verticillium alboatrum* (24-26).

2.4. Grzyby

Dotychczas zakładano, że endofity mikoryzowe zasiedlają egzoderme lub miękisz kory korzenia, znajdujący się w strefie wydłużania lub nieco ponad tą strefą. Jednak u storczyków stwierdzono aż 5 modeli mikoryz, przy których endofity występowały w: 1) bulwach pochodzenia pędowego, 2) podziemnych częściach pędów, 3) szyjce korzeniowej, 4) tylko w korzeniach oraz 5) równocześnie w korzeniach i w pędzie (27). Taka lokalizacja symbionta mikoryzowego nie jest odosobnionym przypadkiem. Od dawna bowiem znane są doniesienia o przerastaniu strzępek grzybów mikoryzowych aż do wierzchołków pędów w starych krzewach rododendronów i azalii (28).

W ostatnich latach izolowano mutualistyczne endofity grzybowe z wielu gatunków traw uprawnych lub występujących na stanowiskach naturalnych. Były to m.in. grzyby z rodzaju *Acremonium* (*A. typhinum*, *A. chrysogenum*), *Trityrachium album*, *Aspergillus fumigatus* czy *Beauveria bassiana*. Grzyby te syntetyzują toksyczne metabolity (lolitrem B i ergowalinę) zabezpieczające rośliny przed żerowaniem szkodników (owady, nicienie). Korzystają one ze związków węgla i azotu gospodarza. Ich strzępki rozgałęziają się w przestworach międzykomórkowych nadziemnych organów traw (zwłaszcza w pochwach liściowych), skąd pobierają składniki pokarmowe poprzez kontakt z apoplastem gospodarza (29). W modelowym systemie interakcji trawa/grzyb badanym dla *Poa ampla* Merr. cv 'Service' i *Acremonium strictum* Morgan-Jones and Gams wykazano obecność proteiny At1 w zasiedlonych roślinach. Enzym At1 należy do grupy związków subtilizynopodobnych, odznaczających się wysoką toksycznością w stosunku do nicieni. Enzymy o zbliżonych właściwościach wytwarza również *Acremonium lolii* oraz *Epichloe festucae* (29,30).

Kolejnym przykładem pozytywnego oddziaływania grzybów endofitycznych jest chronienie drzew przed niektórymi chorobami. W Europie Południowej lasy dębowe zagrożone są przez patogeny z rodzajów *Phytophthora*, *Diplodia*, *Fusarium* i *Cytospora*, których ataki nasilają się w okresach wzmożonej suszy (31). Prawdopodobnie brak wody osłabia wówczas wpływ endofitycznych grzybów takich jak *Hypoxylon mediterraneum*, *Apiognomonina quercina*, *Colpoma quercinum* oraz *Aureobasidium apocryptum*, które współwystępując z patogenami utrzymują je „w ryzach”. Cykl życiowy wymienionych grzybów endofitycznych, nie został do końca zbadany, nie poznano również ich ewentualnych przystosowań do pasożytniczego trybu życia, stąd nie ma pewności, czy są to wyłącznie nieszkodliwe endofity, których obecność w tkankach kory może zapobiegać zamieraniu dębów, czy też w jakiś sposób uczestniczą one w patogenezie (31).

W laboratoriach polskich do grzybów najczęściej izolowanych w kulturach tkankowych należały: dominanty – 57,19% (*Cladosporium sphaerospermum*, *Acremonium roseum*, *Botrytis cinerea* oraz liczne gatunki z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*), influenty

– stanowiące 17% kontaminacji (*Acremonium furcatum*, *A. kiliense*, *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. macrocarpum*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Humicola fuscoatra*, *Mortierella isabelina*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium citrinum*, *P. expansum*, *P. herque* oraz *P. lanosum*), oraz gatunki akcesoryczne (izolowane tylko jeden raz) – 25,81% (32).

Z eksplantatów kłączowych paproci wyizolowano ponad 60 gatunków grzybów glebowych, wśród których najliczniej występowały: *Acremonium strictum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cylindrocarpon destructans*, *Gliocladium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *F. avenaceum*, *Mycellium radices atrovirens*, *Penicillium vinaceum*, *Phialophora cyclaminis*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sesquicillium candelabrum*, *Verticillium albo-atrum*. Były to najczęściej rizosferowe grzyby saprofityczne lub niewirulentne szczepy grzybów patogenicznych bytujące bezobjawowo w okazałych przestworach międzykomórkowych aerenchymy spichrzowej kłącza (33).

3. Metody zwalczania endofitów podczas prekultur

Prekultury to zespół zabiegów przygotowujących całe rośliny, ich organy lub wyizolowane eksplantaty do fazy stabilizacji tkanek *in vitro*. Stosowane są w celu uwolnienia od drobnoustrojów, a także przeciwdziałania brunatnieniu tkanek (spowodowanemu podwyższoną sekrecją polifenoli, utleniających się po zranieniu) oraz odmłodzenia lub przerwania fazy spoczynku eksplantatów (33).

Termin prekultury (*preculture treatments*) odnoszący się początkowo do termoterapii eliminującej wirusy (34), z czasem rozszerzono na inne zabiegi przygotowawcze w „stadium 1” mikrorozmnażania (35). Ostatecznie, prekultury uplasowały się w „stadium 0” pięciostopniowej skali mikrorozmnażania (12-15). Prekultury przeprowadzane są *ex situ* (na roślinach uprawianych w polu, w sadzie lub w szklarni); *in vivo* (na izolowanych liściach, pędach i korzeniach w laboratorium) lub *in vitro* na pożywkach z dodatkiem antybiotyków, fungicydów czy chemoterapeutyków. Rzadko stosowane są *in situ* na stanowiskach naturalnych (14,15,21-23).

W ramach prekultur nadal najważniejsza jest prewencyjna ochrona roślin matecznych, poprzez uprawę w odkażonym termicznie podłożu, osłanianie folią powierzchni roślin uprawianych pod szkłem, kropelkowe nawadnianie roślin, stosowanie filtrów biologicznych oczyszczających wodę do podlewania, cotygodniowe opryski fungicydami, zwalczanie wektorów chorób, stosowanie właściwej agrotechniki i regularnych inspekcji fitosanitarnych mateczników, obniżenie wilgotności względnej powietrza w szklarniach i tunelach foliowych, etiolację pędów lub pobudzanie ich do aktywnego wzrostu przed izolacją eksplantatów (12,26), a także selekcję organów z których będą pobierane eksplantaty, z uwzględnieniem tych, dla których istnieje możliwość skutecznej dezynfekcji powierzchniowej.

Istotnym czynnikiem ograniczającym występowanie zakażeń wśród izolowanych eksplantatów jest testowanie roślin matecznych w celu wykrycia patogenów kwa-

rantannowych, takich jak *Phytophthora* sp., czy *Xanthomonas* sp. (przy użyciu Plant Disease Detection Kit, SIGMA) oraz detekcja patogenów występujących okazjonalnie w uprawie, przy wykorzystaniu metod biochemicznych, serologicznych lub molekularnych (12,17,36). Pośrednią metodą testowania roślin matecznych jest indeksacja eksplantatów w momencie wprowadzania ich do hodowli, przez umieszczenie ponakłuwanych lub ponacinanych skrawków (pobranymi z każdego eksplantatu) w płynnej pożywce bakteriologicznej o pH 6,9, z dodatkiem surowicy bydlęcej (np. Leifert and Waites Sterility Test Medium, SIGMA) (11). Testy wymagają inkubacji w temperaturze 30-35°C przez minimum 28 dni (16,17). Metodę tę zaleca się przy zagrożeniu kontaminacjami bezobjawowymi, powtarzając testowanie eksplantatów podczas kolejnych subkultur, przez pierwsze półrocze. Dwustopniowość kontroli (testowanie roślin matecznych i test izolowanych z nich eksplantatów) stanowi barierę, nie dopuszczającą do namnażania tkanek zawierających bakterie wolno rosnące lub trudne do wykrycia kontaminacje bezobjawowe (11,12). Pojawianie się zakażeń w fazie stabilizacji kultur jest ważnym sygnałem informującym o stanie zdrowotności roślin matecznych. Może także wskazać źródło z którego pochodzą zakażenia.

Jedną z metod eliminowania endofitów są znane od dawna kultury semisterylne całych roślin lub ich organów prowadzone *in vivo*, w celu indukowania wzrostu pąków (bocznych lub przybyszowych), których endofity w specyficznych warunkach prekultury nie zasiedlają (33).

Stosowanie prekultury jest metodą z wyboru dla roślin, których tkanki są zasiedlone przez wirusy, wiroidy, mykoplazmy (19,37), bakterie (18,23) czy grzyby strzępkowe i drożdżoidalne, których endofityczny charakter potwierdzają badania przeprowadzone w ostatnich latach (2,4,30). Standardowe metody powierzchniowego odkażania eksplantatów zawierających endofity zawodzą, gdyż materiał ten wymaga odkażenia wewnętrznego, z wykorzystaniem dostępnych technik umożliwiających uwolnienie od drobnoustrojów. Do dezynfekcji powierzchniowej materiału, przeciętnie zanieczyszczonego mikrobiologicznie, stosujemy podchloryn sodu (NaOCl) lub wapnia (Ca (OCl)₂) w 30% etanolu; świeżą wodę chlorową; 5-20% wodę utlenioną (H₂O₂), lub 0,01% nadmanganian potasu. Natomiast dla kłączy i części pędów bezpośrednio stykających się z podłożem zalecane są: HgCl₂ (0,1-0,5 g l⁻¹) lub wodne roztwory chloroformu czy formaldehydu (16,17). Do eliminowania uporczywych mikroorganizmów epifitycznych przed dezynfekcją powierzchniową stosowano laser (He-Ne laser 632,8 nm 1mW/cm²); mikrofałę (260 W przez 5 min) lub ultradźwięki wzbudzające intensywną wibrację, niwelującą siły powierzchniowej adhezji drobnoustrojów (38). Zabiegi te poprawiały skuteczność dezynfekcji nawet przy stosowaniu środków tak łagodnych jak H₂O₂. Bezpieczną, metodą odkażania bardzo wrażliwych eksplantatów jest stosowanie kolejno trzech kąpiei w środkach odkażających, radykalnie różniących się kwasowością np. w: 0,01 M HCl (o pH 2,36) przez 3 min, następnie w 1% Domestosie (o pH 12,38) przez 10 min, po czym w 2,4 mM kwasie cytrynowym (o pH 2,89) przez 5 min (39). Niezależnie od rodzaju środka odkażającego, niezmiernie ważna jest regularna wymiana używanych lub nazbyt rozcień-

czonych preparatów dezynfekcyjnych, na świeżo przygotowane, o właściwej koncentracji (11).

3.1. Dezynfekcja podwójna i wewnętrzna

W rzadkich przypadkach praktykuje się powtórne odkażanie szczególnie cennych, a przy tym wytrzymałych eksplantatów, które zyskują kolejną szansę na wprowadzenie do kultur (tzw. dezynfekcja podwójna). Zapoczątkowuje ją dezynfekcja trwająca 5-8 min, a po 30 min następuje druga, trwająca o połowę krócej, w świeżym preparacie odkażającym, o tej samej koncentracji.

Wysoką skutecznością w stosunku do drobnoustrojów zasiedlających wiązki przewodzące odznacza się dezynfekcja wewnętrzna, metodą pędzenia ciętych pędów w roztworze 2% sacharozy z dodatkiem 200 mg l⁻¹ cytrynianu 8-hydroksychinolinylu. Dobre efekty uzyskuje się również wykładając eksplantaty na półpłynną pożywkę z dodatkiem zieleni malachitowej 0,5 mg l⁻¹ (silny bakteriostatyk) (38).

W ostatnich latach osiągnięciem jest dezynfekcja wewnętrzna, metodą krótkoterminowej (30 min) infiltracji próżniowej eksplantatów płynną pożywką o pH 3,0 z dodatkiem antybiotyków. Metodę tę opracowano dla eliminowania *Agrobacterium* z transformowanych roślin, kiedy okazało się, że EHA 101 – superwirulentny, najbardziej przydatny do transformacji szczep *A. tumefaciens*, jest wektorem niezmiernie opornym na eliminowanie z tkanek transformantów (40). Cefotaksyna, jak dotychczas najbardziej skuteczny antybiotyk w eliminowaniu EHA 101, nie może być stosowana *in vitro*, ponieważ silnie hamuje wzrost i regenerację tkanek. Inne antybiotyki okazały się nieskuteczne, ponieważ szczep EHA 101 pozostawał latentny podczas wzrostu roślin transformowanych i utrzymywał się w tkankach w stężeniu subliminalnym (poniżej 10³ cfu × g⁻¹ tkanki), niewykrywalnym nawet przy stosowaniu metody PCR. Wysokie ryzyko przeniknięcia do środowiska *A. tumefaciens* „zbiegłego” z roślin transformowanych i potencjalne zagrożenie transmisją horyzontalną genów, przyspieszyło prace nad doskonaleniem metod zwalczania *Agrobacterium* oraz wykrywaniem jego obecności już na poziomie pojedynczych komórek. Z tego względu zastosowano infiltrację próżniową eksplantatów jabłoni zakwaszoną pożywką N6, która zredukowała populację *A. tumefaciens* o 35% już po 0,5 godzinie. Bakterię wyeliminowano po wprowadzeniu do zakwaszonej pożywki N6 200 mg × l⁻¹ karbenicyliny lub mefoksyny (40). Metoda dezynfekcji wewnętrznej znalazła już zastosowanie przy odkażaniu eksplantatów innych gatunków roślin (23).

3.2. Termoterapia

Prekultury roślin zawirusowanych obejmują termoterapię roślin matecznych (w temp. 36-45°C przez 6 tygodni), z których następnie izolowane są bardzo małe

(0,1-0,3 mm) merystemy wierzchołkowe pędów. Dla gatunków tolerujących podwyższoną temperaturę *in vitro* zalecana jest termoterapia (36°C przez 6 tygodni) wyłożonych na pożywkę pąków wierzchołkowych (0,5-0,9 mm), po czym przeniesienie ich na pożywkę indukcyjną z dodatkiem 100 mg \times l⁻¹ ribawiryny. Pozostałe inhibitory namnażania wirusów (np. analogi zasad, niecykliczne azyny) mimo wysokiej skuteczności nie znalazły zastosowania, ponieważ poważnie zakłócają metabolizm eksplantatów *in vitro*.

Podczas prekultur stosowana jest terapia pędów, kłączy, bulw i nasion gorącym powietrzem (36-40°C), eliminująca wirusy, bakterie, grzyby, nicienie, roztocza i owoady. W przypadku cebul *Lilium speciosum* 1 godz. traktowania gorącą wodą o temp. 45-55°C redukuje kontaminacje mikrobiologiczne z 60 do 5%. Jeśli zabieg przeprowadzany jest w okresie spoczynku cebul, wysoka temperatura nie wywiera szkodliwego wpływu na późniejszy przebieg regeneracji (41). Skuteczność terapii antywirusowej sprawdza się testem ELISA przy użyciu poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał, a weryfikuje metodą immunosorpcyjnej mikroskopii elektronowej ISEM.

3.3. Terapia antybiotykowa

Endofity bakteryjne powodują 20-25% strat w fazie stabilizacji eksplantatów (11). Są to jednak szkody o skutkach natychmiastowych, dotyczących indywidualnego eksplantatu, w początkowej fazie kultur. Natomiast endofity latentne, wolno rosnące, nie ujawniające się na określonej pożywce i rozmnożone wraz z proliferującą tkanką, są przyczyną szkód na ogromną skalę, zwłaszcza gdy ujawnią się dopiero w fazie aklimatyzacji, w całym rozmnażanym materiale (42). Aby jak najwcześniej wykryć ich obecność testuje się eksplantaty inicjalne na pożywce NA (Nutrient Agar, Sigma) o pH 7, z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (0,5 mg l⁻¹) i glukozy (10 g l⁻¹), inkubując kultury w temp. 27-35°C przez dwa miesiące, ponieważ kolonie bakterii „Gram+” rosną wolno, jak np. mykobakterie (*Mycobacterium avium-intracellulare* i *M. haemophilum* (21,22)). Wczesnemu ujawnianiu się kontaminacji sprzyja także wyłożenie eksplantatów na pożywkę zestaloną transparentnym gerlite, na którym kolonie bakteryjne są lepiej widoczne niż na matowym agarze (11,12).

Przeciw bakteriom „Gram +” (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus kristinae*, *Staphylococcus saprophyticus*) zalecane jest stosowanie karbenicyliny, bacitracyny, chloramfenikolu, streptomycyny, doksycykliny w HCl, rifampicyny, trimetoprimu, erytromycyny lub penicyliny w dawce 25-200 mg l⁻¹.

Warunkiem skutecznej terapii antybiotykowej jest uprzednia identyfikacja bakterii („Gram+”, „Gram-”), przetestowanie ich wrażliwości na zestaw antybiotyków, oraz ocena fitotoksyczności najsukuteczniejszego preparatu. Wybrany antybiotyk dozowany jest na bazie ustalonej wcześniej dawce MBC (*minimum bactericidal concentration*), a czas trwania terapii jest ściśle limitowany i nie może przedłużać się na kilka kolejnych pasażów (43,44).

Stosowanie pojedynczych preparatów antybakteryjnych lub fungicydów o najszerszym nawet spektrum działania nie wyeliminuje równocześnie wszystkich endofitów zasiedlających tkanki, dlatego korzystne jest łączenie 2-3 antybiotyków, w kombinacji o synergistycznym działaniu, umożliwiającym stosowanie niższych, a przy tym skutecznych stężeń (16,17,43,44). Zalecane jest łączenie aminoglikozydów (gentamycyna, streptomycyna) z β -laktamami (karbenicylina, cefalotyna) oraz z rifampicyną lub polimiksyną (11,22).

3.4. Terapia fungicydami

Do najskuteczniejszych fungicydów należą Benlate i Dithane M-45, stosowane łącznie z antybiotykami (np. karbenicyliną, cefotaksyną, penicyliną G lub siarczanem gentamycyny) (13,14). Popularność zyskały gotowe zestawy do odkażania eksplantatów, np. Antibiotic-Antymycotic Solution SIGMA (22,23). W wielu laboratoriach testowany był PPM (*Plant Preservative Mixture*), zawierający $1,25 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ metylchloroizotiazoliny oraz $0,50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ metylizotiazoliny, który okazał się skuteczny do dezynfekcji nasion i eksplantatów tkankowych, przez moczenie w wodnym roztworze zawierającym $10\text{-}30 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ PPM. Odkażone eksplantaty wykładano na uproszczoną pożywkę zawierającą od 10 do $16 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ tego preparatu na 1-4 dni, po czym pasażowano na pożywkę z dodatkiem $0,5\text{-}2 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ PPM, na której pozostawały 3-4 tygodnie. Po tym okresie eksplantaty wykładano na właściwą pożywkę bez PPM. Preparat całkowicie hamował kiełkowanie zarodników bakterii i grzybów oraz eliminował lub redukował kontaminacje endogenne, nie zakłócając proliferacji kalusa lub regeneracji pąków (17). Inną nowością jest preparat DPC – diethylpyrocarbonate ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$), sterylizujący pożywki bez autoklawowania (45). Preparat dodany do dowolnej pożywki rozkłada się na etanol i dwutlenek węgla w okresie od 30 do 60 min. Po tym czasie, pod wpływem $1000 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ DPC giną wszystkie komórki i zarodniki bakterii i grzybów, znajdujące się w pożywce (45). Z obserwacji własnych wynika, że preparat ten może być z powodzeniem stosowany w prekulturach, do odkażania delikatnego, niezbyt silnie zanieczyszczonego materiału roślinnego.

4. Perspektywy

Coraz większe znaczenie zyskują wprowadzane do praktyki metody indukowania systemicznej odporności poprzez immunizację roślin określonymi szczepami PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*) (46). Badania biochemiczne bakteryzowanych roślin wykazały obecność wielu zmian metabolicznych, indukujących reakcje obronne komórek. Immunizowanie goździków szczepem WCS 417r *Pseudomonas* zwiększyło odporność roślin na *Fusarium oxysporum* poprzez kumulację fitoaleksyn. Ochronę pomidorów przed zainfekowaniem przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis*

lycopersici zapewnia *Pseudomonas fluorescens* szczep 63-28. Obecność bakterii indukuje tworzenie barier strukturalnych (depozyty kalozowe w ścianie) oraz chemicznych (akumulacja i polimeryzacja fenoli oraz flawonoidów), co zwiększało odporność pomidora na fuzaryjne więdnienie (46). Podobne działanie zabezpieczające ogórki przed *Phytophthora ultimum* wykazała bakteria *Serratia plymuthica*, która również indukowała tworzenie barier strukturalnych poprzez odkładanie w ścianie kalozy, pektyn i fenoli, a następnie lignifikację i suberynizację ściany, skutkującą odizolowaniem patogena. Przytoczone fakty z oczywistych względów spowodują wyłączenie z mikrorozmnażania roślin immunizowanych metodą wprowadzania endofitycznych gatunków bakterii, w celu zwiększenia ich odporności na patogeny grzybowe.

Kolejnym przyszłościowym trendem, interesująco się zapowiadającym może będzie metoda inokulacji pędów i liści roślin niemotylikowatych (trzcina cukrowa, ryż, sorgo) kompatybilnymi szczepami bakterii diazotroficznymi *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* i *H. seropedicae*. Osiedlają się one w ksylemie liści i pędów, co stwarza dogodne warunki dla wymiany metabolitów między gospodarzem a endofitami. Chociaż proces wiązania N_2 jest tutaj znacznie zmodyfikowany w porównaniu z mechanizmem typowym dla *Rhizobium* u motylikowatych, to tworzenie sztucznych asocjacji między roślinami zbożowymi i bakteriami wiążącymi azot ma ogromną przyszłość (4,47).

Opisane eksperymenty, łącznie z transformowaniem roślin przyczyniły się do wzrostu liczby gatunków roślin zawierających nie tylko populacje endofitów „naturalnych”, ale przede wszystkim endofitów „introdukowanych”. Stwarza to konieczność nasilenia prac nad doskonaleniem kultur autotroficznych, bez eliminowania drobnoustrojów koegzystujących z organizmem roślinnym, by móc bez przeszkód rozmnażać *in vitro* rośliny prezentujące nową jakość, z wykorzystaniem kultur *in vitro*.

Literatura

1. Cother E. J., Dovling V., (1986), *Plant Pathol.*, 35, 329-336.
2. Serrada J., Sanchez-Serrano J. J., Beltra R., (1982), *Phytopath.*, 104, 309-315.
3. Trappe J. M., Luoma D. L., (1992), *The fungal community*, Eds. Carroll G. C., Wicklow D. T., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 19-27.
4. James E. K., Olivares F. L., Baldani J. I., Dobreiner J., (1997), *J. Exp. Bot.*, 48, 785-797.
5. Swensen S., (1996), *Am. J. Bot.*, 83, 1503-1512.
6. Chanway C. P., (1997), *For. Sci.*, 43, 99-112.
7. Chanway C. P., (1998), *Bacterial endophytes: ecological and practical implications*, Abstr. 7th Int. Congr. of Plant Pathology, Edinburgh, (9-16 August), Scotland.
8. Mark L., Murphy J., Cassells A. C., (1997), *Microbial characterisation and preparation of inoculum for in vitro mycorrhization of strawberry in autotrophic culture*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., 345-351, Kluwer Acad. Publish, the Netherlands.
9. Sharma V. K., Nowak J., (1998), *Can. J. Microbiol.*, 44, 528-536.
10. Barea J. M., Azcon R., Azcon-Aquilar C., (1994), *Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems*, in: *Techniques for mycorrhizal research*, Eds. Norris J. R., Read D., Varma A. K., Acad. Press, 851-876.

11. Leifert C., Morris C. E., Waites W. M., (1994), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, 139-183.
12. Cassells A. C., (1988), *Acta Hort.*, 225, 153-161.
13. Debergh P. C., Read P. E., (1991), *Micropropagation*, in: *Micropropagation. Technology and Application*. Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H., Kluwer Acad. Publish., the Netherlands, 1-13.
14. Cassells A. C., (1991), *Problems in tissue culture: Culture contamination*, in: *Micropropagation. Technology and Application*, Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H., Kluwer Acad. Publish., the Netherlands, 31-44.
15. Cassells A. C., (1997), *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publish, the Netherlands, 1-13.
16. George E. F., (1993), *Plant propagation by tissue culture. Part 1 – The Technology*, Exegetics LTD, England, 132-143.
17. Herman E. B., (1996), *Microbial contaminations of plant tissue cultures*, Agritech Consultants, Inc., Shrub Oak, USA., 1-75.
18. Stead D. E., Elphinstone J. G., Weller S., Hennesy J., (2000), *Acta Hort.*, 530, 45-55.
19. Veronesi F., Bertaccini A., Parente A., Mastronicola M., Pastore M., (2000), *Acta Hort.*, 530, 113-121.
20. Puente M. E., Bashan Y., (1995), *Can. J. Bot.*, 72, 406-408.
21. Leifert C., Waites W. M., (1990), *IAPTC Newsletter*, 60, 2-11.
22. Leifert C., Woodward S., (1997), *Laboratory contamination management; the requirement for microbiological quality assurance*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publish., the Netherlands, 237-245.
23. Leifert C., (2000), *Acta Hort.*, 530, 87-92.
24. Frommel M. I., Nowak J., Lazarovits G., (1991), *Plant Physiol.*, 96, 928-936.
25. Nowak J., (1998), *In vitro Cell Dev. Biol.*, 34, 122-130.
26. Pillay V. K., Nowak J., (1997), *Can. J. Microbiol.*, 43, 354-361.
27. Pridgeon A. M., Chase M. W., (1995), *Am. J. Bot.*, 82, 1473-1495.
28. Kondratowicz R., (1988), *Rhododendrons in the Latvian SSR*, Izdat. Zinatne, Riga.
29. Latch G. C. M., (1998), *Grass endophytes as a model*, Abstr. of 7th Int. Congr. of Plant Pathology, Edinburgh, (9-16 August), Scotland.
30. Reddy P. V., Lam C. K., Belanger F. C., (1996), *Plant Physiol.*, 111, 1209-1218.
31. Vannini A., (1998), *Endophytes and oak decline in southern Europe*, Abstr. 7th Int. Congr. of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland.
32. Kowalik M., Reby E., (1996), *Grzyby zakażające pożywkę i materiał roślinny w hodowli in vitro*, Sympozjum Naukowe PTFit., „Choroby roślin a środowisko”, Poznań (27-28.06.1996).
33. Zenkteler E., (2000), *Systemy wegetatywnego rozmnażania paproci in vivo oraz in vitro*, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
34. Murashige T., (1974), *Plant cell and organ methods in the establishment of pathogen free stock*, in: 2nd Annual A. W. Dimock Lecture, Ithaca, NY, Cornell University.
35. Murashige T., (1977), *Clonal Crops Through Tissue Culture*, in: *Plant tissue culture and its bio-technological application*, Eds. Barz W., Reinhard E., Zenk M. H., Springer-Verl., Berlin, 392-404.
36. van den Houve I., Swennen R., (2000), *Acta Hort.*, 530, 69-79.
37. Candresse T., Lanneau M., Revers F., Kofalvi S., Macquaire G., (2000), *Acta Hort.*, 530, 61-67.
38. Szendrak E., Read P. E., Yang G., (1997), *Prevention and elimination of contamination for in vitro culture of several woody species*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., 233-237, Kluwer Acad. Publish., the Netherlands.
39. Godfrey J., Cross R., (1999), *Micropropagation of Banksia coccinea – A reliable disinfection method*, Abstr. of ISHS Conf. Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation, Eds. Doyle B. M., Curry R. F., Cassells A. C., Univ. of Cork, Ireland, 139-140.
40. Hammerschlag F. A., Liu Q., Zimmerman R. H., Gercheva P., (2000), *Acta Hort.*, 530, 103-111.
41. Langens-Gerrits M., de Klerk G. J., Croes A., (2000), *Acta Hort.*, 530, 289-296.
42. Levin R., Watad A. A., (1996), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 45, 277-280.
43. Falkner F. R., (1999), *Antibiotics in agriculture and horticulture*, Abstr. ISHS Conf. Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation, Eds. Doyle B. M., Curry R. F., Cassells A. C., Univ. of Cork, Ireland.

44. Falkner F. R., (2000), *Acta Hortic.*, 530, 83-86.
45. Macek T. Vanek T., Mackova M., (1995), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 43, 185-190.
46. Benhamou N., Michel N., (1999), *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 709-719.
47. Varga Sz. S., Koranyi P., Preininger E., Gyurjan I., (1994), *Physiol. Plant.*, 90, 786-790.