

# Współczesne metody wykrywania i eliminowania drobnoustrojów podczas mikrorozmnażania

Elżbieta K. Zenktele

Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
Poznań

## 1. Wprowadzenie

W ostatnim dziesięcioleciu dokonano ogromnego postępu w detekcji i identyfikacji drobnoustrojów *in vitro* dzięki zastosowaniu metod biochemicznych, serologicznych i molekularnych. Przyczyniły się do tego duże firmy hodowlane, ponoszące znaczne straty z powodu kontaminacji materiału roślinnego produkowanego techniką mikrorozmnażania. Firmy te, jak również pomniejsi producenci, wobec zagrożenia jakie stanowią dla kultur, np. bakterie latentne, nawiązały współpracę z placówkami biotechnologicznymi, zachęcając je do poszukiwania nowych, szybkich metod testowych, umożliwiających sprawdzenie czy eksplantat inicjalny, a przede wszystkim produkt końcowy mikrorozmnażania, są wolne od drobnoustrojów. Wśród dostępnych obecnie metod, najwyższą czułością i specyficznością oraz szybkim uzyskaniem wyniku testu odznaczają się metody molekularne. W pracy omówiono zastosowanie tych technik podczas mikropropagacji, sytuując je w kontekście pięciu stadiów mikrorozmnażania, na które składają się prekultury, stabilizacja eksplantatów, namnażanie tkanek, przygotowanie eksplantatów do wzrostu *ex vitro* oraz aklimatyzacja *post vitro*. Oczywiście, tradycyjne metody detekcji, które pozostały aktualne i są nadal stosowane w wielu laboratoriach kultur tkankowych, również zostały uwzględnione w tym opracowaniu.

## 2. Prekultury — „stadium 0 mikrorozmnażania”

W okresie przygotowania roślin lub ich organów do izolacji eksplantatów uwaga hodowcy skoncentrowana jest na utrzymaniu roślin matecznych w pełnej zdrowotności, przez stosowanie właściwej agrotechniki i ochrony chemicznej oraz regularnych inspekcji fitosanitarnych upraw, a przy zagrożeniu

plantacji chorobami wirusowymi — termoterapii roślin matecznych (tab. 1). Sprawdzeniem skuteczności wymienionych działań są wyniki mikrobiologicznej, serologicznej lub immunoenzymatycznej indeksacji donora eksplantatów (1).

TABELA 1  
CYKL MIKROROZMNAŻANIA W WARUNKACH ASEPTYCZNYCH KULTUR

<p>STADIUM 0</p> <p>PREKULTURY (przygotowanie roślin matecznych do izolacji eksplantatów)</p>	<p>uprawa elitarnych mateczników w pełni zabezpieczonych przed infekcją — uprawa pod folią, podlewanie kropelkowe, stosowanie systemicznych pestycydów</p> <p>selekcja fenotypowa, testowanie obecności wirusów, bakterii i grzybów</p> <p>przygotowanie roślin matecznych do izolacji eksplantatów — przerwanie okresu spoczynku, rejuwenacja, wybór organu dla pobrania eksplantatu</p>
<p>STADIUM 1</p> <p>STABILIZACJA EKSPANTATÓW (uzyskanie eksplantatów wolnych od obecności drobnoustrojów oraz aktywnych regeneracyjnie)</p>	<p>dezynfekcja powierzchniowa etanol 70%, NaOCl, Ca(OCl)<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, chloramina B, T</p> <p>przeciwdziałanie brunatnieniu esplantatów; wymywanie polifenoli i tanin, absorbcja (węgiel aktywowany, poliwinylpyrolidon), stosowanie antyutleniaczy, inaktywacja fenolazy, obniżanie pH pożywki, zaciemnianie kultur</p>
<p>STADIUM 2</p> <p>NAMNAŻANIE EKSPANTATÓW (rozmnażanie kalusa, pąków, pędów lub zarodków poprzez szereg subkultur na pożywkach o wysokiej zawartości regulatorów wzrostu)</p>	<p>wyбір systemu regeneracji* — organogeneza bezpośrednia, organogeneza pośrednia</p> <p>dobór cytokininy* optymalnie stymulującej regenerację</p> <p>ustalenie parametrów środowiskowych hodowli</p> <p>ustalenie optymalnej liczby subkultur</p>
<p>STADIUM 3</p> <p>PRZYGOTOWANIE DO WZROSTU EX VITRO (elongacja pędów oraz rhizogeneza)</p>	<p>stymulacja wzrostu elongacyjnego pędów</p> <p>indukowanie rhizogenezy <i>in vitro</i> — (dobór auksyny, pożywka dwufazowa)</p> <p>indukowanie rhizogenezy <i>ex vitro</i> — (pożywka płynna, substrat mineralny)</p> <p>odzyskanie samożywności — kultury mikro- i fotoautotroficzne</p>
<p>STADIUM 4</p> <p>AKLIMATYZACJA ROŚLIN (hartowanie roślin przed uprawą w warunkach szklarniowych)</p>	<p>utrwalanie samożywności; wzbogacenie fazy gazowej w CO<sub>2</sub></p> <p>zabezpieczenie przed stresem wodnym (zamgławianie, osłony z folii)</p> <p>zwiększenie natężenia światła</p>

\* w przypadku gatunków rozmnażanych po raz pierwszy



Terminem „prekultury” określa się zespół zabiegów, które przygotowują organy roślin lub wyizolowane eksplantaty tkankowe do wprowadzenia do kultur *in vitro*. W wyniku prekultury uzyskujemy m.in. rejuwenację (odmłodzenie) tych organów oraz eliminujemy znaczną część zasiedlających je drobnoustrojów. Jednym ze znanych zabiegów przygotowawczych jest pędzenie ciętych gałązek (odkażonych w NaOCl z dodatkiem Tweenu 20) w roztworze cytrynianu 8-hydroksychinoliny (200 ppm) z dodatkiem 2% sacharozy. Pąki roślin drzewiastych izolowane z tak przygotowanego materiału są w wysokim procencie wolne od kontaminacji (2). Mniej znana jest metoda prekultury na tzw. wyściółce siarczynowej. Inkubacja eksplantatów przez 24 godziny na wyściółce (bibuła, lignina) nasyconej roztworem wodnym metadwusiarczynu potasu (80g/l), dziesięciokrotnie zmniejszyła ilość drobnoustrojów w dalszej hodowli (2).

### 2.1. Detekcja drobnoustrojów w „stadium 0”

Indeksacja roślin matecznych, której celem jest eliminowanie wszystkich patogenów, w tym kwarantannowych, np. *Phytophthora*, *Xanthomonas* i inne (przy użyciu Plant Disease Detection Kit SIGMA), przez wyłożenie na płynne lub zestalone pożywki standardowe, jałowo ponakłuwanych lub ponacinanych skrawków z wytypowanej rośliny, zabezpiecza przyszłe kultury przed wprowadzeniem kontaminacji. Zastosowanie zestawu trzech specjalistycznych pożywek bakteriologicznych: 1) ekstraktu drożdżowo-glukozowego, 2) pożywki glukozowej typu Sabouraud, oraz 3) pożywki AC pozwala wykryć obecność większości bakterii, drożdży i grzybów, po inkubacji skrawków w temperaturze 25-30°C przez 28 dni.

Indeksacji eksplantatów inicjalnych w momencie ich wprowadzania do hodowli dokonujemy przez umieszczenie skrawków w płynnej pożywce bakteriologicznej o pH 6,9 (np. Leifert and Waites Sterility Test Medium SIGMA). Jeśli skrawek zawiera bakterie, to ich zawiesinę pasażuje się na szereg pożywek różnicujących. Jeśli natomiast ujawnią się grzyby, grzybnię pasażuje się na pożywkę PDA (ziemniaczano-glukozowa), SNA (syntetyczną) lub maltozową (Malt-agar), w celu ich identyfikacji. Zaleca się powtarzanie testu na płynnej pożywce podczas każdej kolejnej subkultury, w ciągu pierwszego półrocza hodowli (3).

Dwustopniowość kontroli (testowanie roślin matecznych i test izolowanych z nich eksplantatów) stanowi wystarczającą barierę, gwarantującą niedopuszczenie do namnażania tkanek zawierających kontaminacje latentne (tab. 2).

TABELA 2  
KONTROLA KONTAMINACJI PODCZAS CYKLU MIKROROZMNAŻANIA

<p>STADIUM 0</p> <p>PREKULTURY (redukcja egzo- i endogennych kontaminantów)</p>	<p>zabezpieczenie roślin przed infekcją przez patogeny oraz przed zasiedleniem przez populacje epifitów (osłony z folii, podlewanie kropelkowe, pestycydy stosowane systemicznie)</p> <p>indeksacja roślin matecznych; wykrywanie wiroidów, wirusów, mykoplazm, bakterii, drożdży i grzybów</p> <p>ustalenie i wyeliminowanie źródła kontaminacji</p> <p>chemo-, termoterapia oraz terapie kombinowane roślin matecznych i organów wytypowanych do izolacji eksplantatów</p>
<p>STADIUM 1</p> <p>STABILIZACJA EKSPANTATÓW (detekcja i identyfikacja kontaminacji)</p>	<p>dezynfekcja powierzchniowa eksplantatów (wspomagana przez laser, mikrofałę, ultradźwięki), dezynfekcja podwójna, dezynfekcja wewnętrzna</p> <p>indeksacja eksplantatów inicjalnych przy użyciu klasycznych metod serologicznych, immunoenzymatycznych oraz zestawów pożywek mikrobiologicznych</p> <p>identyfikacja kontaminantów przy zastosowaniu technik molekularnych (amplifikacja kwasów nukleinowych <b>PCR, LCR, TAS, SDA</b>)</p> <p>odrzućenie kontaminacji pierwotnych i wtórnych ujawniających się w I i II pasażu, chemo-, termo-, antybiotyko-terapia <i>in vitro</i></p>
<p>STADIUM 2</p> <p>NAMNAŻANIE EKSPANTATÓW (mikrobiologiczne monitorowanie kultur, detekcja kontaminacji latentnych)</p>	<p>monitorowanie kultur (testowanie fragmentu tkanek z każdego eksplantatu w płynnej pożywce mikrobiologicznej)</p> <p>eliminowanie vitropatogenów (obniżanie pH, eliminowanie nadmiernego uwodnienia pożywki, modyfikacja fazy gazowej)</p> <p>detekcja bakterii latentnych i subliminalnych na płynnych pożywkach mikrobiologicznych</p> <p>identyfikacja kontaminacji latentnych, jak w „stadium 1”</p> <p>sukcesywna kontrola standardów aseptyki laboratoryjnej</p>
<p>STADIUM 3</p> <p>PRZYGOTOWANIE DO WZROSTU <i>EX VITRO</i> (mikoryzacja lub bakteryzacja kultur)</p>	<p>kokultury (wprowadzenie mikroflory antagonistycznej dla patogenów); bakteryzacja i mikoryzacja kultur</p> <p>detekcja i identyfikacja kontaminacji jak w „stadium 1”</p>
<p>STADIUM 4</p> <p>AKLIMATYZACJA ROŚLIN (pełna ochrona fitosanitarna)</p>	<p>kontrola obecności wirusów, testy serologiczne, immunoenzymatyczne, mikrobiologiczne (do certyfikatu zdrowotności roślin pochodzących ze szkła)</p> <p>termiczna dezynfekcja podłoża do wysadzania roślin</p> <p>chemiczna ochrona wysadzonych roślin</p>



## 2.2. Źródło kontaminacji

Najczęściej kontaminacje wnoszone są wraz z eksplantatami izolowanymi z roślin nietestowanych, lub porażonych bezobjawowo przez grzyby, drożdże, bakterie, mykoplazmy, riketsje, wirusy lub wiroidy. Źródło uporczywych kontaminacji stanowią również eksplantaty pobierane z roślin uprawianych w polu lub z ich organów podziemnych, zasiedlonych przez epifity fyllo- i rhizoplany, które trudno wyeliminować podczas dezynfekcji powierzchniowej (3). Odkazanie mogą przetrwać drobnoustroje epifityczne, które w przypadku liści znalazły schronienie wśród włosków i łusek oraz w pofałdowaniach powierzchni epidermy leżącej nad wiązkami przewodzącymi, w hydatodach, okolicach aparatów szparkowych, zbiorniczkach olejków eterycznych, w obszarach śluzowaciejących czy w strefie starzejących się tkanek. W przypadku pąków schronienie to zapewniają łuski lub przylistki. Miejsca te są na ogół niedostępne dla dezynfektantów (4). Endofity przestrzeni międzykomórkowych i endofity komórkowe mogą również ukryć się wewnątrz parenchymy lub łyka, podobnie jak endofity fakultatywne, bądź słabe patogeny kolonizujące rany, które we wnętrzu tkanek unikają kontaktu z dezynfektantem (4). Częstym źródłem kontaminacji może być skażona mikrobiologicznie woda używana do podlewania roślin (5).

## 2.3. Prewencja

Przestrzeganie procedury zapobiegającej kontaminacjom obowiązuje na każdym etapie hodowli. W „stadium 0” największy nacisk kładzie się właśnie na prewencję. Składają się na nią: specjalne traktowanie roślin matecznych redukujące populację epifitów (podlewanie kropelkowe, filtrowanie wody do podlewania, osłanianie folią powierzchni roślin w uprawach pod szkłem, regularne opryski fungicydami lub antybiotykami, uprawa w odkażonym termicznie podłożu, obniżenie wilgotności względnej powietrza, walka z wektorami chorób, etiolacja pędów i pobudzanie ich do aktywnego wzrostu). Kolejnym sposobem zapobiegania jest selekcja eksplantatów, uwzględniająca wyłącznie te, dla których istnieje gwarancja łatwego przeprowadzenia dezynfekcji powierzchniowej, skutecznie eliminującej populację mikroorganizmów zasiedlających ich powierzchnię (6). Istotnym elementem profilaktyki jest również diagnostyka bakterii fitopatogenicznych, izolowanych z eksplantatów i roślin zainfekowanych bezobjawowo, przy wykorzystaniu metod biochemicznych, serologicznych (ELISA) lub molekularnych (PCR). Zwłaszcza podstawowe testy biochemiczne, ze względu na ich prostotę i niski koszt, zasługują podczas prekultur na szczególną uwagę.

## 3. Stabilizacja eksplantatów — „stadium I mikrorozmnażania”

Uzyskanie aseptycznego eksplantatu przy zachowaniu jego pełnej zdolności regeneracyjnej jest trudnym zadaniem. Dezynfekcja powierzchniowa przy użyciu podchlorynów sodu ( $\text{NaOCl}$ ) i wapnia ( $\text{Ca(OCl)}_2$ ), azotanu srebra



(AgNO<sub>3</sub>), wody chlorowej, wody utlenionej H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5-20%), nadmanganianu potasu (0,01%) czy HgCl<sub>2</sub> (tab. 1) nie zawsze okazuje się skuteczna przy eliminowaniu mikroorganizmów epifitycznych, a w przypadku endofitów całkowicie zawodzi. Poprawę rezultatów odkażania zapewnia wspomaganie dezynfekcji technikami prezentowanymi w kompendium E.B. Hermana (2), a zatem traktowaniem kultur laserem (25-50 impulsów po 30 s XeCl), lub działaniem ultradźwięków. Intensywna wibracja przy zastosowaniu ultradźwięków obniża siły powierzchniowej adhezji drobnoustrojów, co pozwala na użycie łagodniejszych środków odkażających.

Nadal praktykuje się wstępne odkażanie nasion, bulw, kłączy i cebul gorącą wodą (50-54°C przez 1 godzinę), dezynfekcję podwójną organów pozostających w kontakcie z glebą (dwukrotne odkażanie w 3,5% NaOCl, kolejno przez 15 i 5 min) oraz dezynfekcję wewnętrzną. Ten ostatni zabieg, poprzedzający dezynfekcję powierzchniową, polega na wstawieniu pędów na 24-36 godzin do roztworów: tiosiarczuanu srebra (818 mg l<sup>-1</sup>), siarczuanu 8-hydroksychinolinoliny (800 mg l<sup>-1</sup>), siarczuanu potasu lub siarczuanu aluminium (600 mg l<sup>-1</sup>), a następnie na izolacji paków, do których systemem waskularnym dotarły już substancje odkażające (2).

Często działanie dezynfektantów kojarzone jest z użyciem fungicydów (Benlate, Dithane M-45, Kaptan). Benlate dodawany jest niekiedy do pożywki we wstępnym etapie hodowli. Okazało się jednak, że jego długotrwałe oddziaływanie na eksplantaty jest fitotoksyczne, jeśli nie będzie on rozpuszczany w DMSO (2).

Do roztworu dezynfekcyjnego dodaje się również pojedyncze antybiotyki (np. karbenicylinę, cefotaksim, penicylinę G lub siarczan streptomycyny). Oprócz antybiotyków stosowanych indywidualnie, praktykuje się użycie gotowych zestawów antybiotyków (Antibiotic-Antimycotic Solution SIGMA) (6).

### 3.1. Wykrywanie i identyfikacja drobnoustrojów w „stadium I”

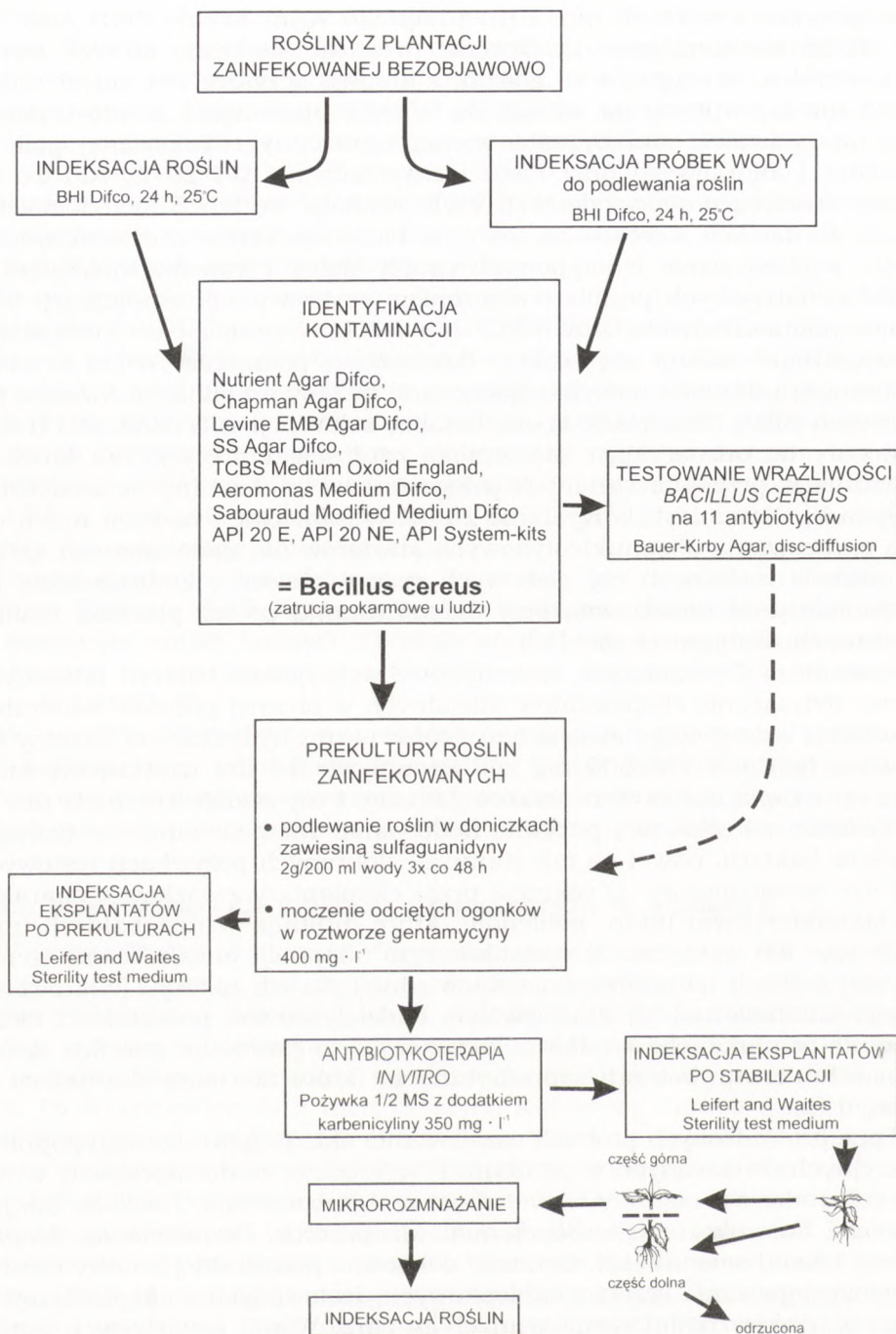
W przypadku nieskutecznej dezynfekcji powierzchniowej, lub zasiedlenia tkanek przez endofity, już po kilku dniach od wyłożenia eksplantatów, na pożywce ukazują się kolonie bakterii, drożdży lub grzybów. Często występują infekcje mieszane, bakteryjno-grzybowe. Na podstawie kontroli makroskopowej te kontaminacje pierwotne są eliminowane i przekazywane do identyfikacji. Po wyprowadzeniu z nich czystych kultur wg standardowych metod bakteriologicznych, izolaty np. bakterii są barwione metodą Grama; a następnie poddawane testom biochemicznym, wykrywającym obecność enzymów takich jak żelatynaza, oksydaza; testom O/F (na utlenianie lub fermentację glukozy), na utylizację metyl- $\alpha$ -D glikozydu, tworzenie barwnika fluorescencyjnego na pożywce King B, tworzenie indolu oraz testowi ruchliwości. Testy te wymagają czasu oraz nakładu pracy, lecz ich zaletą jest prostota i możliwość przeprowadzenia w przeciętnych warunkach laboratoryjnych (7). Wyniki testów wsparte charakterystyką bakterii (8), umożliwiają identyfikację wyizolowanych szczepów do rodzaju i gatunku. Specjalistyczne laboratoria mikrobiologiczne identyfikują bakterie na podstawie gotowego ze-



stawu pożywek testowych (np. BHI, Chapman Agar, Levine EMB Agar, SS Agar, TCBS Medium) (rys. 1). Obecnie preferuje się testy, których wyniki można uzyskać w ciągu 24-48 godzin, a stopień oczyszczenia kultur bakteryjnych nie ma wpływu na odczyt. Są to testy ujawniające źródło utylizacji węgla na podstawie zmiany zabarwienia tetrazoliny zredukowanej podczas utleniania komórkowego oraz testy identyfikacyjne API 20 E, API 20 NE (również opierające się na detekcji utylizowanego węgla). Z metod molekularnych do detekcji zalecane są testy na bazie markerów chemotaksonomicznych, porównywanie fenotypowych profili białek i kwasów tłuszczowych, a także genotypowych profili, z włączeniem restrykcji lub amplifikacji fragmentów polimorficznych DNA (RFLP lub AFLP). Natomiast do identyfikacji drobnoustrojów stosuje się reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w wersji podstawowej i licznych modyfikacjach; inne metody amplifikacji kwasów nukleinowych (SDA, TAS, NASBA) oraz analizę sekwencji 16S rRNA (9-11) (tab. 2). Metody te, odznaczające się wysoką czułością i precyzją, są łatwe do stosowania w przypadku znanych już gatunków bakterii (np. w medycynie, weterynarii). Natomiast, korzystanie z PCR w rolnictwie i hodowli roślin wymaga opracowania oligonukleotydowych starterów dla mało znanych gatunków bakterii roślinnych czy glebowych oraz wiąże się z koniecznością powtarzania testów, nieodzowną przy diagnozowaniu po raz pierwszy rzadziej spotykanych drobnoustrojów (10).

W „stadium I” rozpoczyna się rutynowe wykrywanie bakterii latentnych, poprzez wytrząsanie eksplantatów inicjalnych w płynnej pożywce mineralno-glukozowej, wzbogaconej ekstraktem drożdżowym, hydrolizatem kazeiny lub peptonem (w ilości 250-500 mg l<sup>-1</sup>). Po upływie 14 dni uzyskujemy informację czy eksplantat zawiera mikroorganizmy i czy nadaje się, bądź nie, do przeniesienia na właściwą pożywkę hodowlaną. Nieujawnianie się pewnych gatunków bakterii, nawet na tak starannie dobranych pożywkach testowych, może być spowodowane: 1) sekrecją przez eksplantaty związków o charakterze antybakteryjnym (m.in. polifenoli), które inhibują wzrost bakterii uniemożliwiając ich wykrycie, 2) spowolnieniem adaptacji metabolicznej i energetycznej bakterii na pożywce nieodpowiedniej dla ich rozwoju (cukrowcowa represja kataboliczna), 3) długotrwałym oddziaływaniem pozostałości niedostatecznie wypłukanego środka odkażającego, co powoduje powolny wzrost i rozmnażanie, np. bakterii saprofitycznych, (które nie mają charakteru latentnego) (2).

W przeprowadzonych próbach oszacowania składu gatunkowego populacji bakteryjnych, izolowanych w „stadium I” wykazano, że do najczęściej występujących rodzajów należały: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Xanthomonas* (13). Ostatnio dokonano pionierskiej analizy częstotliwości występowania grzybów strzępkowych, izolowanych z eksplantatów licznych gatunków roślin rozmnażanych *in vitro*. Wśród oznaczonych gatunków wyróżniono grupę dominantów (57,17%), influentów (37,76%) oraz gatunków akcesorycznych (7,05%). W grupie dominantów najwyższą frekwencję wykazywały saprofityczne epifity z rodzajów *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botry-*



Rys. 1. Detekcja, identyfikacja i zwalczanie *Bacillus cereus* podczas mikrorozmnażania *Diefenbachia picta* (wg Zenkteler, Włodarczyk i Kłosowskiej, 1996).



*tis*, *Cladosporium* i *Penicillium*. W grupie influentów pojawiały się niektóre endofity z rodzajów *Alternaria*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Humicola* i *Mortierella* (12).

### 3.2. Źródło kontaminacji

W „stadium 1” ujawnia się około 50-70% kontaminacji o charakterze pierwotnym, wniesionych z eksplantatem inicjalnym, oraz 30-50% kontaminacji wtórnych, spowodowanych nieprzestrzeganiem aseptyki laboratoryjnej (13). W każdej pracowni mogą pojawiać się inne, unikatowe niekiedy „kontaminacje wewnątrzlaboratoryjne” (m.in. związane ze specyfiką rozmnażanego materiału), które wymagają indywidualnego opracowania procedury ich eliminowania (13).

### 3.3. Prewencja

Właściwa sterylizacja pożywek (tylko małe objętości przy traktowaniu, np. mikrofalami), aseptyczne pasażowanie i namnażanie tkanek, wymiana starych lub nazbyt rozcieńczonych środków odkażających na świeżo przygotowywane, zachowanie aseptyczności kultur podczas całego okresu trwania hodowli, utrzymanie czystości pomieszczeń laboratoryjnych, autoklawowanie naczyń zawierających kontaminacje bez uprzedniego ich otwierania, regularna wymiana filtrów w stołach z laminarnym przepływem powietrza, częste szkolenia pracowników w aseptycznej metodyce pracy; to reguły, których przestrzeganie jest szczególnie istotne podczas stabilizacji kultur (3). Z zabiegów prewencyjnych w „stadium 1” wspomnieć należy o termo-, chemo- i antybiotykoterapii eksplantatów na pożywce.

Częstokroć terapeutyczny efekt wywołuje wyłożenie zainfekowanej tkanki na pożywkę. Tak dzieje się w przypadku niektórych wirusów, inaktywowanych po izolacji i wyłożeniu na pożywkę merystemów wierzchołkowych zawirowanych roślin.

#### 3.3.1. Termotherapia *in vitro*

Traktowanie eksplantatów (np. merystemów wierzchołkowych lub kalusa) podwyższoną temperaturą (36°C podczas dnia i 30°C w nocy przez 4 do 8 tygodni) eliminuje wiele wirusów, a także bakterie systemicznie zasiedlające tkanki przewodzące roślin. Dobierając eksperymentalnie reżim terapeutyczny dla konkretnego gatunku rośliny i rodzaju wirusa należy uwzględnić zakres temperatur pomiędzy optimum stymulującym wzrost a maksimum tolerowanym jeszcze przez eksplantat (6). Interesującą możliwością eliminowania wirusów stwarza krioprezerwacja merystemów. Na niskie temperatury szczególnie wrażliwe są wiroidy. Traktowanie kultur niską temperaturą (1-5°C) przy niedostatku światła jest efektywną metodą zwalczania tej grupy patogenów.



### 3.3.2. Chemoterapia *in vitro*

Pozytywne efekty chemoterapii bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Micrococcus* i *Staphylococcus* uzyskano po wprowadzeniu do pożywki bakteriostatyku ASA (kwas acetylosalicylowy) w stężeniu 20-50  $\mu\text{M}$ .

Jednak największą popularność wśród chemoterapeutyków zyskała ribawiryna (Virazole), która nie tylko przeciwdziała replikacji wirusów, lecz także degraduje ich cząsteczki (6). Ribawiryna jest skuteczna przy szerokim zakresie stężeń (5-100  $\text{mg l}^{-1}$ ) i nie wykazuje fitotoksycznego działania na tkanki roślin. W terapii kombinowanej (1) płynna pożywka z dodatkiem ribawiryny, 2) termoterapia 32°C przez 25 dni, 3) izolacja merystemów, jej skuteczność znacznie wzrasta (2).

Z preparatów dawniej stosowanych, warto wspomnieć 2-tiouracyl (inhibujący syntezę wirusowego RNA) oraz zieleń malachitową, jednak brakuje zgodnej opinii co do ich skuteczności w warunkach *in vitro* (6,16).

Do testowania zdrowotności roślin uzyskanych z eksplantatów poddanych chemo- lub termoterapii, stosuje się rośliny wskaźnikowe, surowice poli- i monoklonalne, test ELISA oraz analizę kwasów nukleinowych (dsRNA, c-DNA).

### 3.3.3. Antybiotykoterapia *in vitro*

Antybiotykoterapia jest jedną z nielicznych metod postępowania leczniczego w przypadku bakterii endogenicznie zasiedlających tkanki. Właściwie dobrany antybiotyk, o dobrej rozpuszczalności, stabilny w pożywce, nie inaktywujący się pod wpływem światła i temperatury, niewrażliwy na pH, kompatybilny z innymi antybiotykami, nie indukujący odporności, bez działań ubocznych, tani, nietoksyczny dla ludzi — gwarantuje pełny efekt leczniczy (14). Po zidentyfikowaniu bakterii, testuje się ich wrażliwość na zestaw antybiotyków metodą dyfuzji w żelu agarowym Bauer-Kirby. Dla potrzeb hodowli tkankowych szczególnie zalecane są: ampicylina, karbenicylina, cefotaksim, gentamycyna, polimyksyna, rifampicyna, siarczan streptomycyny oraz timentin, z których każdy ma stosunkowo wąskie spektrum działania (15). Nadal pozostaje otwarta kwestia czy antybiotyki oddziałują stymulująco na wzrost tkanek i przebieg organogenezy w trakcie dalszej hodowli, czy też ich wpływ ma charakter pośredni, poprzez wyeliminowanie kontaminacji (2,14). Z uzyskanych danych z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre z nich (np. cefotaksim) stymulują embriogenezę lub proliferację tkanki kalusowej, a nawet mogą zastąpić takie regulatory wzrostu jak 2,4-D.

W przypadku zasiedlenia eksplantatu dwoma lub trzema kontaminantami (bakterie gram „+”, gram „-” lub grzyby), najkorzystniejsze jest stosowanie kombinacji kilku antybiotyków, zwłaszcza kiedy dają one tzw. efekt synergistyczny, który umożliwia znaczne obniżenie dawki każdego z komponentów zestawu, w porównaniu z wysokością dawki stosowanej indywidualnie (16). Amfoterycyna B, nystatyna, carbendazim oraz fenbendazol należą do antybiotyków wykazujących właściwości fungicydów i są preparatami często włą-



czanymi do „koktailu” terapeutycznego w przypadku kontaminacji bakteryjno-grzybowych.

Dużą pomocą w antybiotykoterapii jest dokładne ustalenie minimalnej dawki inhibującej wzrost określonego gatunku bakterii (MIC — *minimum inhibition concentration*) oraz minimalnej dawki skutecznej przy jej zwalczaniu (MBC — *minimum bactericidal concentration*). Określenie poziomu fitotoksyczności (płynna pożywka o pH 6,5-7,5; z różnymi stężeniami antybiotyku), stanowi zabezpieczenie przed możliwym uodpornieniem się bakterii. Ten antybiotyk, który niszczy bakterie przy dawce 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , a nie jest szkodliwy dla eksplantatu nawet przy dawce 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , może być bezpiecznie stosowany w kulturach tkanek (16). Należy przy tym uwzględnić, że dawka terapeutyku efektywna w stosunku do wyizolowanego szczepu w warunkach *in vitro*, często okazuje się nieskuteczna przy bezpośrednim zastosowaniu na uprawianą roślinę. Poważnym błędem jest również „profilaktyczne” stosowanie niewielkich dawek antybiotyków, których działanie tylko okresowo ogranicza rozwój drobnoustrojów. Przedłużanie terapii tego rodzaju prowadzi do uodporniania się bakterii na dany preparat (1).

#### 4. Namnażanie eksplantatów — „stadium II mikrorozmnażania”

To okres namnażania kalusa, zarodków, pąków, sadzonek węzłowych lub wieloroślinek. W czasie tym dysponujemy już aseptycznym materiałem, który należy starannie zabezpieczać przed wtórną kontaminacją (tab. 1).

##### 4.1. Detekcja kontaminacji

W „stadium II” mikrorozmnażania jedynie wielkotowarowa produkcja może być rygorystycznie monitorowana mikrobiologicznie. W tym celu z każdego eksplantatu pobierane są skrawki, które testuje się w płynnej pożywce (Bacteria Screening Medium SIGMA). Do wykrywania bakterii latentnych zalecane są pożywki: YGC (ekstrakt drożdżowy, glukoza, węglan wapnia), PYA (pepton, ekstrakt drożdżowy, agar), PYGA (pepton, ekstrakt drożdżowy, glukoza, agar) i wiele innych, o recepturach poszerzonych o komponenty mineralne (16). Ze względu na wybitną wybiórczość wymagań niektórych bakterii, konieczne jest przetestowanie szeregu pożywek (np. Cassells — zaleca do tego celu 11 pożywek o różnych składach), co umożliwi „trafienie” na pożywkę promującą wzrost identyfikowanej bakterii (17). Opracowano kilka nieskomplikowanych procedur metodycznych, umożliwiających detekcję niektórych bakterii latentnych występujących w kulturach (13,17,18). W analizie wyników identyfikacji mikroorganizmów, wykazano, że spektrum gatunkowe kontaminacji zmienia się wraz z wiekiem kultury, (stopniowo przechodząc od najwcześniejszych wykrywanych gatunków typowo epifitycznych dla danej rośliny, poprzez latentne endofity, czy też tzw. „kontaminacje laboratoryjne” aż do incydentalnie zawleczonych mikroorganizmów bytujących na skórze człowieka (*Lactobacillus acidophilus*, *Micrococcus kristinae*, *Staphylococcus epidermidis*) (3).



Wiele saprofitycznych gatunków bakterii, drożdży czy grzybów (tzw. kontaminanty pierwotne), w specyficznych warunkach kultur tkankowych („próżnia ekologiczna”, pełna dostępność substratu) oraz pod wpływem szczególnego stanu fizjologicznego w jakim znajduje się eksplantat, zachowuje się jak tzw. „vitropatogeny”. Ich metabolity zmieniają pH i potencjał osmotyczny pożywki, toksyny zatrująją eksplantat, a enzymy macerują jego tkanki (3). Częściowo można ograniczyć rozwój, np. grzybów, redukując wilgotność względnej fazy gazowej w naczyniach hodowlanych oraz zwiększając stężenie agaru do 0,9 – 1,5%. Z kolei obniżenie pH pożywki hamuje rozwój bakterii. Krótkotrwała ekspozycja na pożywkę o pH 3,5 (już po godzinie) zabija większość bakterii, a niekiedy także grzyby i drożdże, nie szkodząc przy tym eksplantatom (3).

Kolejną możliwość znacznego zredukowania populacji saprofitycznych kontaminantów (aż do poziomu nieszkodliwego dla kultur tkankowych) stwarza system hodowli w bioreaktorze. Zainstalowane tam filtry membranowe o średnicy porów 0,2  $\mu\text{m}$  eliminowały zawiesinę bakteryjną, np. *Bacillus* z płynnej, rotowanej pożywki, w której namnażane było *Syngonium* (24). Jednak użycie ukorzenionych pędów na pożywce zestalonej, wymagało osłony z antybiotyku (rifampicyna w dawce 30 mg l<sup>-1</sup>). Pozytywny wynik tego eksperymentu jest kolejnym potwierdzeniem spotykanych w kulturach *in vitro* przypadków rozmnożenia tkanek zawierających kontaminanty subliminalne.

#### 4.2. Źródło kontaminacji

Pojawianie się w „stadium II” kontaminacji wtórnych, może być spowodowane m.in. niedostateczną znajomością zasad profilaktyki oraz nieprzestrzeganiem aseptyki laboratoryjnej. Mogą im sprzyjać incydenty, takie jak defekt stołu z nawiewem, niedokładna sterylizacja instrumentów i pożywek, niezajomość faktu, że np. drożdże wykazują znaczną odporność na dezynfekcję przy użyciu alkoholu, a endospory *Bacillus* odznaczają się wytrzymałością na wysokie temperatury, np. opalanie). Ciągłe jeszcze niewystarczająca jest wiedza o przenoszeniu kontaminacji z naczynia do naczynia przez roztozca laboratoryjne (2).

W „stadium II” wraz z namnażaniem tkanek mogą być powielane pierwotne kontaminacje latentne, spowodowane przez bakterie endofityczne, nie zawsze patogeniczne, które należą do rodzajów *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Methylobacterium*. Jednym z sygnałów ich obecności może być spowolnienie tempa wzrostu namnażanych kultur (3). Ta grupa bakterii o słabo poznanej ekologii, bytuje bezobjawowo w przestworach międzykomórkowych tkanki mięksiszowej i przewodzącej wielu roślin. Po umieszczeniu eksplantatów na pożywce endofity potrzebują czasu (niekiedy nawet kilku miesięcy), by zaadaptować się do warunków *in vitro*. Obecność kontaminacji latentnych często ujawnia się dopiero po pasażowaniu tkanki na pożywkę o składzie faworyzującym wzrost bakterii.



### 4.3. Prewencja

Zabezpieczenie kultur przed kontaminacjami laboratoryjnymi wymaga stałej kontroli czystości powietrza w pomieszczeniach pracowni i testowania sterylności stołów z nawiewem. Najczęściej stosuje się do tego celu metodę wykładania otwartych płytek Petriego. Ponadto kontrolą należy objąć prawidłowość funkcjonowania autoklawów i urządzeń do sterylizacji drobnego sprzętu (3). Bezwzględnie należy zwalczać roztocza, wykładając półki papierem nasączonym akarycydem (pirydaben, difocol), stosując pułapki samoprzylepne oraz repelenty (np. mentol) (18).

## 5. Przygotowanie do wzrostu *ex vitro* „stadium III mikrorozmnażania”

W fazie przygotowania roślin do wzrostu *ex vitro* stymuluje się pędy do elongacji, a następnie do ukorzenia się. W tym celu paki, pędy lub zarodki pasażowane są na pożywkę o zredukowanym poziomie cukrowców, soli mineralnych i regulatorów wzrostu. W miarę potrzeby wycofuje się lub wprowadza do pożywek składniki niezbędne na danym etapie hodowli (tab. 1).

### 5.1. Detekcja kontaminacji

Dysponujemy stosunkowo skąpa liczbą danych na temat wykrywania kontaminacji w tym stadium. Na podstawie literatury wiadomo, że pasaż eksplantatów na pożywkę o zmienionym składzie sprzyja ujawnieniu się latentnych dotychczas kontaminacji (3,6). Oczywisty przykład późnego wykrycia utajonych kontaminacji opisano, np. dla nieukorzeniających się sadzonek węzłowych czereśni, które poza tym nie wykazywały żadnych objawów infekcji. Dopiero podczas izolowania z nich protoplastów w płynnej pożywce stwierdzono obecność wolno rozwijających się bakterii. W testach identyfikacyjnych wykazano, że były to *Pseudomonas syringae* oraz *Agrobacterium rhizogenes* (19). Fakt nieukorzenia się pędów od dawna uważany jest za jeden z przejawów latentnej kontaminacji. Podobnie dzieje się w przypadku drobnoustrojów występujących w ilościach niewykrywalnych (koncentracja subliminalna  $10^8$ - $10^{10}$  cfu/cm<sup>3</sup>), które nie ujawniają się na płynnej pożywce bakteriologicznej. Można je zlokalizować jedynie przy użyciu immunofluorescencji lub mikroskopu elektronowego, co z uwagi na wysoki koszt i ograniczoną dostępność do urządzeń jest rzadko stosowane (2).

Wysoce niepokojąca, jak się wydaje, jest możliwość udanego rozmnożenia, ukorzenia uzyskanych pędów, a nawet wysadzenia ich do szklarni, pomimo że są one zainfekowane przez bakterie latentne. Propagacja zainfekowanych kultur obarczona jest ryzykiem zwiększenia wirulencji rozmnażanego *in vitro* szczepu lub możliwością jego przekształcenia się w szczep patogeniczny, który dopiero podczas szklarniowej uprawy roślin może spowodować znaczne straty.



## 5.2. Źródło kontaminacji

Tkanki eksplantatów bezobjawowo zasiedlonych przez patogeniczne bakterie takie jak: *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganense*, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, oraz *Xanthomonas campestris* przez cały okres namnażania *in vitro* zachowują te latentne kontaminanty. Przyczyny latencji pozostają, jak dotąd, słabo wyjaśnione. Wysoce prawdopodobne wydaje się przypuszczenie, że pod wpływem regulatorów wzrostu zawartych w pożywce znacząco wzrasta koncentracja białek warunkujących odporność rośliny na patogeny. Innym aspektem tego zjawiska może być wzmożenie produkcji metabolitów o znacznej aktywności, np. przeciwwirusowej, czy przeciwbakteryjnej. Wymienione mechanizmy z pewnością mogą wpływać na nieujawnianie się licznych patogenów *in vitro*. Po wysadzeniu roślin, okresowe działanie mechanizmów odporności słabnie, a patogeny atakują swoich dotychczasowych żywicieli (3).

## 5.3. Prewencja

Obecnie wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem drobnoustrojów produkujących substancje antybakteryjne lub fungistatyczne podczas hodowli zawiesinowej. Interesującym tego przykładem może być wytwarzanie przez *Bacillus subtilis* fungistatyku przeciw *Cryptonectria parasitica* (2).

Nowy pogląd na zagadnienie kontroli kontaminacji dały prace dotyczące poszukiwania elicytorów (molekuł sygnałnych do wzbudzania reakcji obronnych rośliny na czynniki chorobotwórcze), które stymulują wytwarzanie fitoaleksyn. Przykładem elicytora biotycznego jest, np. chitozan (odacetylowana pochodna chityny), natomiast abiotycznego jest fosetyl glinu — substancja aktywna o charakterze fungicydu, na bazie której opracowano preparat Aliette 80WP.

## 6. Aklimatyzacja roślin — „stadium IV mikrorozmnażania”

Wysadzanie roślin do podłoża jest najbardziej krytycznym okresem, podczas którego nasila się zagrożenie związane z ujawnianiem się kontaminacji latentnych oraz z atakiem drobnoustrojów glebowych (tab. 1). Wirusy, wiroidy, mykoplazmy, riketsje czy spiroplazmy, których obecność nie dawała żadnych objawów podczas hodowli tkanek, mogą odzyskać lub wzmóc swoją wirulencję po wysadzeniu roślin. Jednakże nieaktywny czynnościowo system korzeniowy młodych roślinek, źle funkcjonuje w środowisku glebowym i z łatwością ulega infekcjom. Dotyczy to również epidermy liści i pędów, o skąpo wykształconej kutykuli i nieaktywnych aparatach szparkowych. Osłabione stresem wilgotnościowym rośliny, nie tolerują zabiegów chemicznej ochrony, co stanowi dodatkowe zagrożenie dla uprawy.



## 6.1. Detekcja kontaminacji

W dostępnej literaturze znajduje się sporo danych dotyczących wykrywania drobnoustrojów we wczesnych stadiach (0, I i II) mikrorozmnażania. Natomiast, niewiele prac dotyczy ujawniania obecności drobnoustrojów w okresie ukorzeniania i aklimatyzacji, kiedy najczęściej uaktywniają się bakterie latentne (tab. 2) oraz pewne wirusy, które również nagromadziły się w namnażanej tkance. Wzrost ich koncentracji pozwala na detekcję przy zastosowaniu metod serologicznych. Wykrycie wszystkich kontaminacji w ostatnim stadium mikrorozmnażania jest nieodzowne przed wystawieniem certyfikatu zdrowotności i dopuszczeniem do obrotu rozmnożonego materiału roślinnego.

Obieg informacji dotyczących najnowszych metod wykrywania drobnoustrojów (2,20,21), a także szybkość wdrażania tych metod przez firmy korzystające z mikrorozmnażania oraz instytucje powołane do wydawania świadectw zdrowotności dla materiału roślinnego (pochodzącego ze szkła), mają decydujące znaczenie dla skuteczności zwalczania kontaminacji w kulturach *in vitro*.

## 6.2. Prewencja

Poszukiwanie metod ulepszających system mikrorozmnażania zaowocowało nową techniką jaką jest kokultywacja tkanek roślinnych i drobnoustrojów. Pozytywne wyniki prac nad stymulowaniem tkanek eksplantatów do organogenezy pod wpływem drobnoustrojów otwierają nowe perspektywy w tej dziedzinie (2). Cassells i wsp., badając interakcje między drobnoustrojami rhizosferowymi a rośliną, w krytycznym dla niej okresie aklimatyzacji, stwierdzili, że zasiedlenie systemu korzeniowego (jeszcze w próbówce) przez symbionta skutecznie zabezpiecza roślinę przed atakiem patogenów glebowych, po wysadzeniu do podłoża (22). Najnowszym osiągnięciem tego zespołu jest opracowanie trójczłonowego systemu prewencji, który rozpoczyna się mikoryzacją korzeni (np. truskawki) sterylnym izolatem VAM *Glomus intraradices*, a kończy — bakteryzacją całej asocjacji. Zabieg ten nie należy do łatwych w warunkach kultur heterotroficznych, charakteryzujących się wysoką koncentracją soli mineralnych i cukrów, które inhibują kiełkowanie zarodników grzyba mikoryzowego. Również uzyskanie aseptycznego, odpowiednio rozcieńczonego inokulum mikoryzowego nastęrczało wiele trudności. Mikoryzacja w kulturach autotroficznych (pożywka Hoaglanda, 4 zarodniki grzyba na 1 eksplantat) przebiegała natomiast bez zakłóceń. W warunkach systemu autotroficznego, próby włączenia do asocjacji także tzw. „bakterii wspomagających” również zakończyły się powodzeniem. Otrzymany zespół „roślina — VAM — bakterie” wykazywał wysoką odporność na stres wilgotnościowy (m.in. poprzez redukcję potencjału osmotycznego tkanek rośliny oraz rozbudowę jej systemu korzeniowego, jeszcze w warunkach *in vitro*) (22).

Pozytywne rezultaty uzyskano również z ziemniakami, prowadząc je w kulturze z wyselekcjonowanymi szczepami symbiotycznych bakterii. Były to



niepatogeniczne szczepy *Pseudomonas* lub *Xanthomonas*, introdukowane do pożywki ukorzeniającej dla ziemniaków. Bakteryzacja w sposób istotny zwiększyła odporność roślin na stres aklimatyzacyjny (23). Ten rodzaj „indukowanej symbiozy”, usprawniał szybkość reakcji roślin na stres. Obecność bakterii stymulowała wzrost elongacyjny pędu, silniejsze rozgałęzianie się korzeni, wzmożoną produkcję włósników oraz przyspieszała tuberyzację (tworzenie się mini-bulwek). Ponadto aktywizowała funkcjonowanie aparatów szparkowych i przyczyniała się do prawidłowej lignifikacji wiązek przewodzących. W efekcie bakteryzacji, ziemniaki wysadzone do gruntu prędzej tworzyły stolony i były dwukrotnie odporniejsze na *Verticillium albo-atrum* niż rośliny nie bakteryzowane (23).

## 7. Podsumowanie

Alternatywny system mikrorozmnażania w przypadku uporczywych, trudnych do wyeliminowania (wyłącznie niepatogenicznych) drobnoustrojów może stanowić niesterylna propagacja (25,26). Jej początki datują się od czasów automatyzacji mikrorozmnażania, co pociągnęło za sobą prawdziwą rewolucję w wielkotowarowej produkcji roślin klonowanych. Odrzucenie ograniczeń jakie nakładał wymóg aseptyczności kultur heterotroficznych (pożywka zawierała związki organiczne i cukrowce), stało się najważniejszą zaletą metody, a zarazem źródłem kolosalnych oszczędności. W alternatywnym systemie fotoautotroficznym, rośliny mogą być prowadzone niesterylnie, w kontenerach z tworzywa, na podłożu z pianki poliuretanowej, wysyczonej przepływającą pożywką, nie zawierającą związków organicznych. System oparty jest na gatunkach roślin charakteryzujących się wysokim poziomem chlorofilu w licznych chloroplastach. Rośliny rozwijają się „samożywnie” w atmosferze wzbogaconej w CO<sub>2</sub>, przy doświetlaniu światłem o wysokim natężeniu oraz w warunkach pełnej klimatyzacji (25,26). Najwyższą rentowność w systemie fotoautotroficznym uzyskuje jedna z najprostszych, a zarazem najstarszych technik mikrorozmnażania — sadzonkowanie segmentów węzłowych pędów, dowolnego gatunku, który nadaje się do tego sposobu propagacji.

Omówiony system jest pozytywnym przykładem całkowitej zmiany podejścia do problemu kontaminacji *in vitro*. Możemy przestać się ich obawiać ponieważ potrafimy skutecznie (i tanio) ich unikać. Natomiast w systemach „wyśrubowujących” aseptykę pracy i zwiększających częstotliwość testów i kontroli, koszty uzyskania 1 rośliny będą stale wzrastać. W kontekście stale pojawiających się prac, w których dowodzi się, że nierealne są wszelkie próby otrzymania roślin całkowicie wolnych od wszystkich drobnoustrojów, jest to niezmiernie stresujące. W tej sytuacji, w systemie alternatywnym (przy całym szeregu ograniczeń) stwarza się możliwość opuszczenia tego „błędneho koła” i proponuje się nowe perspektywy na przyszłość.



## Literatura

1. Leifert C., Woodward S., (1996), *Laboratory contamination management; the requirement for microbiological quality assurance*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 237-245.
2. Herman E. B., (1996), *Microbial contaminations of plant tissue cultures*, Agritech Consultants, Inc., Shrub Oak, USA, 1-75.
3. Leifert C., Morris C. E., Waites W. M., (1994), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13, 139-183.
4. Epton H., (1996), *Epiphytic bacteria: activities, risks and benefits*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 299-309.
5. Zenkteler E., Włodarczyk K., Kłosowska M., (1996), *The application of antibiotics and sulphonamid for eliminating Bacillus cereus during the micropropagation of infected Dieffenbachia picta Schott*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 183-193.
6. Cassells A. C., (1996), *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 1-15.
7. Reed B. M., Piyarak Tanpresert, (1995), *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1, 137-142.
8. Krieg N. R., Holt J. G., (1984), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
9. Reeves J., (1996), *Molecular diagnostic for pathogen detection in seeds and planting material*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 83-97.
10. Seal S., (1996), *Cost analysis of detection of bacteria and phytoplasmas in plant tissue cultures by PCR*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Mayo Edit. Serv., Ballynew, Ireland, 123-131.
11. Stead D. E., Hennessy J., Wilson J., (1996), *Modern methods for identifying bacteria*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. E., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 61-75.
12. Kowalik M., Reby E., (1996), *Grzyby zakażające pożywkę i materiał roślinny w hodowli in vitro*, w: *Materiały Symp. Nauk. PTF. Choroby roślin a środowisko*, red. Mańka M., 27-28.06.1996, Poznań, 397-401.
13. Leifert C., Waites W. M., (1990), *IAPTC Newsletter*, 60, 2-11.
14. Falkiner F. R., (1990), *IAPTC Newsletter*, 60, 13-26.
15. Falkiner F. R., (1996), *Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation. What are we aiming at?*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 155-161.
16. George E. F., (1993), *Plant propagation by tissue culture*, 1, *The Technology*, Exegetics LTD, England, 132-143.
17. Cassells A. C., (1991), *Problems in tissue culture: culture contamination*, in: *Micropropagation*, Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H., Kluwer Acad. Publish., Netherlands, 31-44.
18. Debergh P. C., Read P. E., (1991), *Micropropagation*, in: *Micropropagation*, Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H., Kluwer Acad. Publish., Netherlands, 1-13.
19. Kamoun R., Lepoivre P., Boxus P., (1996), *Evidence for the occurrence of endophytic procaryotic contaminants in micropropagated plantlets of Prunus cerasus L. „Montmorency”*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 145-149.
20. Zenkteler E., (1997), *Problematyka obrad II Międzynarodowego Sympozjum Bacterial and Bacteria-like Contaminants of Plant Tissue Culture*, Cork, Ireland, IX 1996, Hod. Rośl. Nas., 2, 134-137.
21. Zenkteler E., (1997), *Elimination of contaminants and explants browning during micropropagation by pre-treatment of rhizome of Thelypteris palustris*, I Konferencja „Metody różnicowania, identyfikacji i przechowywania patogenów roślin” IOR Poznań, 24.04.1997, *Pol. Agric. Ann.*, ser. E, 26, 141-149.



22. Mark G. L., Murphy J., Cassells A. C., (1996), *Microbial characterization and preparation of inoculum for in vitro mycorrhization of strawberry*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 345-351.
23. Nowak J., Asiedu S. K., Bensalim S., Richards J., Stewart A., Smith C., Stevens D., Sturz A. V., (1996), *From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual cultures of potato and beneficial bacteria*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 321-331.
24. Levin R., Watad A. A., et al., (1996), *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 45, 277-280.
25. Long R. D., (1996), *Photoautotrophic micropropagation — a strategy for contamination control*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 267-279.
26. Sayegh A. J., Long R. D., (1996), *Use of Hortifoam substrate in micropropagation system. Comparative study of sugar-based and sugar-free medium*, in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassells A. C., Kluwer Acad. Publ., Netherlands, 279-287.

## Modern approaches to the elimination of contaminants in micropropagation

### Summary

For efficient *in vitro* multiplication of plants, every step of micropropagation should be taken care at in order to prevent contamination. Indexation of stock plants, explants and cultures for contaminants is based on a series of morphological, physiological and biochemical tests, which can be supplemented with modern methods. To ensure that the material is free from the major pathogens, rapid, sensitive and specific diagnostic methods are required. The identification methods used for diagnosis and detection of plant tissue contaminants are based on two main strategies:

1) for identification of new species of contaminants it is recommended to use:

- serological tests, nutritional kits, tests incorporating chemotaxonomic markers (based on proteins and fatty acids),
- a comparison of phenotypic or genetic profiles including those based on restriction or amplification of fragment length polymorphism of DNA;

2) for classification of new species it is recommended to use:

- reagents (as antisera, nucleic acids probes, oligonucleotide primers) for polymerase chain reaction (PCR);
- general methods of comparison of the test strain with a reference strain.

Antibiotics or fungistatics should be applied in tissue culture to eliminate identified contaminants. Treatment of index-negative explants with combinations of antibiotics is the most effective method to eliminate contaminants from plant tissue culture. Because of high costs of treatment and their phytotoxicity, antibiotics should only be used against identified contaminants from valuable mother plants.

### Key words:

*in vitro* contaminants, latent bacteria, methods of detection, micropropagation.

### Adres do korespondencji:

Elżbieta Zenkteler, Instytut Biologii Eksperymentalnej im. Adama Mickiewicza, al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań, fax: 48-61-52 36 15.