



Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro*

¹Teresa Orlikowska, ¹P. Sobiczewski, ¹M. Zawadzka,
²Elżbieta Zenkteler

¹Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniązka,
Skierniewice

²Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Zakład Botaniki Ogólnej, Poznań

The control and eradication of bacterial infections and contaminations in plant tissue culture

Summary

Bacterial contamination is a serious problem in plant tissue culture. In *in vitro* cultures, bacteria are introduced, with the initial which is most frequently explants, but bacterial contamination can also come from the laboratory environment or from the staff themselves. Exogenous bacteria are easier to deal with, but endogenous bacteria remain problematic. Standard sterilization with ethanol, NaOCl or HgCl₂ and with antibiotics can now be enriched with new components (NaDCC, AgNO₃, nano-silver) or sanitation products (PPM™, ProClin® 300, Biosept 33 SL, Vitrofur®[®], Dekaben). Some of these can be incorporated into a multiplication and rooting medium for one or more passages, if they are not phytotoxic to the plant explants. A special problem is presented by cryptic or viable but not cultivable bacteria which can be unable to multiply during many passages, but finally be disclosed in mass. The issue is, therefore, to find and apply tools for detection of selective media and/or molecular markers. The above questions are discussed in the present paper based on the literature and results of our own study.

Key words:

biocides, covert or cryptic bacteria, detection of bacteria, identification of bacteria, disinfection.

Adres do korespondencji

Teresa Orlikowska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa
im. Szczepana Pieniązka,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

2 (89) 57–71 2010

1. Wstęp

Bakterie towarzyszą roślinom, bytując zarówno na ich powierzchni, jak i wewnątrz tkanek. Ich wpływ na życie roślin nie zawsze jest możliwy do określenia. Najlepiej poznane są bakterie najbardziej szkodliwe, wywołujące choroby roślin. Wpływ bakterii niepatogenicznych, żyjących w tkankach lub na powierzchni różnych gatunków roślin jest poznany w mniejszym stopniu, a wiele z nich może wspomagać wzrost roślin w wyniku różnego rodzaju korzystnych oddziaływań (1-5).

Także w kulturach roślin *in vitro* stwierdzono zarówno pozytywne, jak i negatywne oddziaływanie bakterii (6-11). Bakterie mogą istotnie oddziaływać na metabolizm roślin. Scherling i wsp. (11) stwierdzili duże zmiany w zawartości jedenastu metabolitów w eksplantatach pędowych topoli po zanieczyszczeniu bakterią *Paenibacillus* sp., a widocznym efektem działania tej bakterii była wyższa efektywność ukorzenienia mikro-pędów. Thomas i wsp. (12) obserwowali epigenetyczne zmiany morfologiczne w obrębie kultur arbuza zasiedlonych przez bakterie utajone (ang. *cryptic, covert*). Zmiany te zanikały po uwolnieniu kultur od bakterii za pomocą odkażania w podchlorynie sodu i dodania antybiotyków do pożywki. Brak możliwości jednoznacznego zdefiniowania roli bakterii powoduje, że każde zanieczyszczenie należy traktować, jako potencjalny induktor zmiany warunków życiowych eksplantatów, w tym także pogorszenia wydajności mikrorozmnażania. W doświadczeniach fizjologicznych zanieczyszczenia bakteryjne kultur mogą istotnie fałszować wyniki, w stopniu zależnym od rodzaju interakcji bakteria-roślina. Problemy zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro* przedstawione w pracy przeglądowej Orlikowskiej i Zawadzkiej (9) pozostają wciąż aktualne. Celem tej pracy jest kolejne przybliżenie tego problemu na podstawie publikacji, które ukazały się w wydawnictwach naukowych w latach 2006-2009 oraz w piśmiennictwie wcześniejszym, uprzednio nie przytoczonym.

2. Zanieczyszczenia bakteryjne na etapie inicjacji kultur roślinnych *in vitro*

Bakterie są najczęściej wnoszone do kultur z eksplantatem inicjalnym. Dezynfekcja eksplantatów inicjalnych umożliwia usunięcie bakterii z powierzchni, ale całkowite odkażenie wewnętrznych tkanek jest właściwie niemożliwe z powodu fitotoksyczności środków odkażających. Odkażanie powierzchniowe eksplantatów, szczególnie pobranych z warunków naturalnych, jest utrudnione, ponieważ biofilmy, w których żyją bakterie, stanowią aktywną barierę dla środków odkażających (13). Bariere tę można naruszyć przez stosowanie surfaktantów, np. detergentów (14), co zresztą jest powszechnie stosowane w odkażaniu eksplantatów roślinnych. Thakur i Sood (15) zaproponowali odkażanie wielowęzłowych odcinków pędów bambusa, zamiast jednowęzłowych. Ten sposób miał chronić pąki boczne przed zamieraniem i zapobiegać przemieszczaniu się bakterii wraz ze środkiem sterylizującym.

Przyjmuje się, że im mniejszy eksplantat jest wprowadzany do kultur, np. merystem wierzchołkowy lub boczny, tym większe prawdopodobieństwo, że zanieczyszczenie bakteriami będzie mniejsze, ponieważ bakterie przenoszą się przede wszystkim przez system naczyniowy i znajdują się w jego pobliżu, a merystem, nie mając połączenia z tkanką przewodzącą, jest najczęściej od nich wolny. Istnieją jednak udokumentowane przykłady, że bakterie mogą także bytować wewnątrz pąków, w komórkach zewnętrznej warstwy merystemów i w komórkach otaczających prze wody żywicowe, co stwierdzono u *Pinus sylvestris* (16), a także wewnątrz komórek korzeni włośnikowych *Eleutherococcus* (17).

Thomas i wsp. (18,19) przeprowadzili szczegółowe badania nad stopniem zasiedlenia bakteriami kultur banana, zainicjowanych po intensywnej sterylizacji odrostów korzeniowych, obejmującej wytrząsanie przez noc w zawieszynie fungicydu Bavistin (karbendazym) i roztworze antybiotyku streptocykliny, następnie po przepłukaniu w wodzie sterylnej i wycięciu wewnętrznych części, przez godzinę w roztworze preparatu antyseptycznego Cetrimide (alkyltrimethylammonium bromide), a na koniec, po kolejnym usunięciu zewnętrznych części, w 4% roztworze NaOCl lub 0,1% HgCl₂. Wypreparowane, po 8-krotnym płukaniu wodą sterylną wierzchołki, długości 10-12 mm wykładano na różne pożywki. Fragmenty pędów były indeksowane na pożywkach bakteryjnych – agarze odżywczym (Nutrient Agar – NA) i 523 (20). Zanieczyszczenia na pożywce do namnażania pędów ujawniały się stopniowo. W pierwszym pasażu wśród otrzymanych izolatów zidentyfikowano 6 rodzajów (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Staphylococcus*), po 4-7 pasażach 10 rodzajów (*Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*), a po ok. 2 latach (19 pasażach) dalszych 5 rodzajów (*Brachy bacterium*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Tetraspaera*, *Staphylococcus*). Łącznie dokonano identyfikacji 31 izolatów. Bakterie, które ujawniły się w 4-7 pasażu i po 19 pasażach nie były formami bezwzględnie wymagającymi określonych warunków do rozmnażania, ale należały do grupy bakterii żywotnych, nie dających się hodować, a zdolności do rozmnażania nabrały po kilku-kilkunastu miesiącach.

Bakterie, które nie rosną na pożywkach, są trudne do wykrycia, zarówno metodami mikrobiologicznymi, jak i biologii molekularnej. Stevenson i wsp. (21) proponują pewne działania poprawiające skuteczność wykrywania bakterii nie dających się hodować. Pożywka powinna zawierać sole mineralne nisko stężone i kompleks witamin oraz niewielkie ilości azotu organicznego, ew. dodatek kwasu huminowego, katalazy lub pirogronianu. Kultura powinna być obserwowana przez co najmniej 30 dni. Na tej pożywce kolonie mogą być bardzo małe (\pm 0,2 mm), a zatem kulturę należy przeglądać w powiększeniu. Pomocna może być inkubacja w atmosferze o podwyższonej do 5% zawartości CO₂ lub obniżonej do 2% zawartości O₂. W przypadku detekcji bakterii wolnorosnących za pomocą markerów DNA można zwiększyć wykrywalność przez zwiększenie ilości DNA bakteryjnego w wyniku zmywania kolonii z pożywki.

Według Dahm i Strzelczyka (22) do pojawiania się bakterii nie rosnących na pożywkach bakteryjnych mogą przyczyniać się, m.in. letalne lub subletalne uszkodzenia komórek czynnikami chemicznymi lub fizycznymi, starzenie się, spadek potencjału replikacyjnego, stres oksydacyjny, podłoża powodujące metaboliczną destrukcję z powodu nadprodukcji rodników tlenowych. Takie zdarzenia mogą powstać w trakcie sterylizacji eksplantatów inicjalnych, a brak zdolności do wzrostu może być odpowiedzią adaptacyjną na zaistniały stres. Autorzy, jako następne możliwe powody braku zdolności do mnożenia się bakterii sugerują także lizogenię zainicjowaną przez bakteriofaga lub odpowiedź na sygnalizację międzykomórkową.

Thomas i wsp. (23) przeprowadzili doświadczenie nad wykrywalnością bakterii w eksplantatach inicjalnych z wierzchołków pędów papai. Po sterylizacji wg Thomas i wsp. (18), i umieszczeniu pędów na pożywkach inicjalnych, w 35-50% eksplantatów ujawniły się endogenne bakterie. Dodatkowe 14-17% kultur usunięto po indeksacji na pożywkach mikrobiologicznych. Z pozostałych eksplantatów, wizualnie czystych przez 8 pasaży, wyizolowano DNA ośmiu rodzajów bakterii, nie ujawniających się również na pożywkach bakteryjnych. Ich obecność potwierdzono w obrazach mikroskopowych soku wyciśniętego z pędów, po barwieniu negatywnym lub w kontraście fazowym. Bakterie trzech rodzajów rosły na pożywkach po dodaniu tkanek rośliny-gospodarza. Te bakterie stymulowały wzrost siewek papai (24). Pędy papai, indeksowane na sześciu pożywkach bakteryjnych, nie wykazały obecności bakterii po roku kultury. Jedynym obserwowanym objawem, mogącym wskazywać na obecność bakterii w eksplantatach, była zmieniająca się wydajność mnożenia i ukorzeniania pędów, z tendencją do obniżania w miarę starzenia się kultur.

Wyniki tych doświadczeń nie są dostatecznym dowodem, aby sądzić, że wszystkie kultury roślinne zawierają bakterie, ale powinny być ostrzeżeniem, że taka ewentualność może wystąpić. Staranny i przemyślany wybór eksplantatów inicjalnych, poprzedzony prekulturą roślin donorowych w szklarni w szczególnym reżimie sanitarnym oraz wybór optymalnego sposobu sterylizacji, powinny prowadzić do zmniejszenia liczebności bakterii zasiedlających te eksplantaty. W wielu publikacjach zawarta jest informacja o skuteczności odkażania standardowego w uwalnianiu eksplantatów inicjalnych od bakterii, jednak okres obserwacji był krótki i żadne dodatkowe procedury detekcji oprócz indeksowania na pożywkach bakteryjnych nie były stosowane, co może budzić podejrzenie, że obecność bakterii żywych, ale nie rosnących na pożywkach nie została wykryta.

Najczęściej stosowana procedura odkażania eksplantatów inicjalnych obejmuje następujące etapy: płukanie w wodzie bieżącej, płukanie w wodzie z detergentem, płukanie w alkoholu, odkażanie zasadnicze sublimatem rtęci lub podchlorynem wapnia lub sodu, zakończone płukaniem w wodzie sterylnej. Procedura ta może być wzbogacona lub zmodyfikowana przez zastąpienie związków nieorganicznych chloru związkami organicznymi o dłuższej aktywności i małej fitotoksyczności – dichloroizocjanuronem sodu (NaDCC) (25-27), zastosowanie preparatu Plant Preservation Mixture – PPM™ (26,28), preparatu ProClin®300 (29), zastosowanie roztwo-

rów o różnicowanej kwasowości (pH 2-3 i 11-12) (26,30, Zenkteler i wsp., dane nie publikowane), antybiotyków (31,32), temperatury od 35 do 50°C (33,34), związków nanosrebra (35, Zenkteler i wsp., dane nie publikowane) i innych bakteriobójczych preparatów. Boine i wsp. (36) zwracają uwagę na olejki eteryczne, z których dwa – tymiankowy i z trawy cytrynowej hamowały rozwój bakterii na pożywkach bakteryjnych na równi z penicyliną. W naszych doświadczeniach olejek tymiankowy był skuteczny w zwalczaniu bakterii, ale równocześnie bardzo toksyczny w stosunku do eksplantatów gerbery, maliny, jabłoni i hosty (dane nie publikowane). Eliminacja bakterii tworzących endospory wymaga 2 lub 3-krotnego odkażania eksplantatów w odstępach 1-2 dni (37).

Traore i wsp. (38) informują, że do skutecznego odkażania pąków zimowych dąglezi wystarcza opalenie przez 3-5 sekund pąków zanurzonych uprzednio w 95% etanolu, a następnie wyizolowanie merystemów lub małych wierzchołków.

Ujawnianiu obecności bakterii w eksplantatach inicjalnych po odkażeniu może sprzyjać dodatek do pożywki inicjalnej azotu organicznego, np. w formie peptonu, ekstraktu drożdżowego lub albuminy mlecznej, na której będą mogły rozmnażać się bakterie saprobiontyczne. Chen i Yeh (39) podają, że uniknięcie zanieczyszczeń bakteryjnych było możliwe, w przypadku gdy rośliny donorowe *Aglaonema* nie były podlewane w szklarni przez 2 miesiące.

W celu obniżania kosztów mikrorozmnażania, możliwe jest stosowanie chemicznego odkażania naczyń i pożywki, zamiast energochłonnego autoklawowania (40,41). Według Teixeira i wsp. (40), autoklawowanie naczyń można zastąpić płukaniem dejonizowaną wodą z dodatkiem 10 kropli/l 2% NaClO po umyciu, a bezpośrednio przed użyciem zastosować powtórne płukanie wodą chlorową, sporządzoną przez dodatek 2 kropli podchlorynu sodu, co daje stężenie aktywnego chloru 0,0003%. Użycie do sporządzenia pożywki wody chlorowej o tej samej zawartości aktywnego chloru całkowicie zapobiegało zakażeniom oraz zwiększało dwukrotnie efektywność mnożenia pędów i świeżą masę eksplantatu ananasa. Te wskazówki powinny być przydatne w procedurach mikrorozmnażania opartych na systemie fotoautotroficznym, bez cukru i przy większej intensywności światła. Fuller i Pizzey (42) proponują wdrożyć na ćwiczeniach dla studentów i uczniów szkół średnich podobną procedurę, w której nie jest wymagane autoklawowanie.

3. Zanieczyszczenia bakteryjne na etapie namnażania i ukorzenia kulturek roślinnych *in vitro*

Pomimo zastosowania najlepszej praktyki sanitarnej bakterie mogą ujawnić się nagle w czasie namnażania i/lub ukorzenia pędów. Szczególnie sprzyja temu wydłużanie czasu inkubacji na „starej” pożywce oraz zmiany warunków prowadzenia kultury – temperatury lub oświetlenia. W namnażających się kulturach roślinnych znajdowano bakterie pochodzące najczęściej ze środowiska naturalnego roś-

lin, a także ze środowiska człowieka, również gatunki, które wywołują choroby ludzi (18). Nie jest to niczym niezwykłym, ponieważ obecność bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Klebsiella* stwierdzano w roślinach w uprawie polowej (43,44), skąd mogły być przeniesione do kultur w eksplantatach inicjalnych, ale równie prawdopodobne jest wprowadzenie ich do kultur przez personel.

W przypadku zanieczyszczenia kultur roślinnych bakteriami niepatogenicznymi, które w niewielkim lub w niezauważalnym stopniu obniżają kondycję eksplantatów, można zastosować preparaty, które, dodane do pożywki, ograniczą rozmnażanie się bakterii, a równocześnie nie mają działania fitotoksycznego (tab.). Preparatem specjalnie dedykowanym do zastosowania w kulturach roślinnych jest Plant Preservation Mixture (PPM)[™] (45). O skuteczności tego preparatu w eliminacji bakterii i braku fitotoksyczności w odniesieniu do melona, tytoniu i petunii donosili Compton i Koch (46), podkreślając jednak konieczność eksperymentalnego ustalenia stężenia preparatu w odniesieniu do rodzaju rośliny. W naszych doświadczeniach PPM[™] zastosowany w stężeniach polecanych przez producenta, nie uszkadzał kultur anturium, chryzantemy, gerbery, hosty, maliny, malwy pensylwańskiej i jabłoni (dane nie publikowane). Sharaf-Eldin i Weathers (47) stwierdzili przydatność PPM[™] do całkowitej eliminacji *Bacillus subtilis* i *Penicillium chrysogenum* z kultur *Arabidopsis* i *Artemisia* w bioreaktorze, którego działanie jest oparte na wytwarzaniu odżywczej mgły.

Bakteriobójczy bądź bakteriostatyczny wpływ AgNO_3 jest znany, a związek ten jest od dawna stosowany, np. do odkażania wody (48). AgNO_3 był używany także w kulturach roślinnych *in vitro*. Kubota i Tadokoro (49) donosili, że dodatek 10 mg/l azotanu srebra znacznie ograniczał zanieczyszczenia bakteryjne w fotoautotroficznych kulturach pomidora, bez wpływu na morfogenezę eksplantatów. Azotan srebra dodany do pożywki w stężeniu 10 mg/l zastępował toksyczną dla kultur róży karboksylinę, użytą w celu eliminacji *Agrobacterium tumefaciens* po kokultywacji (50). Azotan srebra może jednak wpływać na bilans hormonalny eksplantatów z powodu znoszenia wrażliwości tkanek roślinnych na etylen, co w zależności od gatunku rośliny, etapu wzrostu kultury i rodzaju pożywki może mieć wpływ pozytywny lub negatywny na morfogenezę. Stosowanie tego związku w każdym pasażu w kulturach gerbery (51), klonu ozdobnego i maliny (Orlikowska i wsp., dane nie publikowane) powodowało występowanie nadmiernego uwodnienia pędów (szklistości), natomiast włączanie go do pożywki, co dwa lub trzy pasáže, podtrzymywało potencjał regeneracyjny bez niekorzystnego wpływu na jakość kultur. Należy podkreślić, że związki zawierające grupę tiolową, np. L-cysteina, inaktywują antibakteryjne działanie AgNO_3 (52). Przyszłością mogą być preparaty nanosrebra, które są szeroko polecane do dezynfekcji i zabezpieczania przed ponownymi zakażeniami różnych produktów i przedmiotów stosowanych w gospodarstwie domowym, medycynie, budownictwie, ubrań i in. (www.nanoco.eu).

González-Olmedo i wsp. (53) polecali Vitrofur (G-1) do stosowania w kulturach płynnych ananasa w bioreaktorze o działaniu opartym na okresowym zanurzeniu eksplantatów (RITA[®], ang. *Temporary Immersion System*). Vitrofur jest biocydem po-

Tabela
Dostępna charakterystyka preparatów stosowanych w odkażaniu eksplantatów inicjalnych i jako dodatek do pożywki dla zahamowania rozwoju zanieczyszczeń bakterijskich. Informacje uzyskane z charakterystyk produktu od producentów i z publikacji naukowych

1	2	3	4	5	6	7
Preparat/związek producent	Skład chemiczny	Przeznaczenie	Stężenie biobójcze	Sposób działania	Sposób podania do pożywki	Fitotoksyczność
Plant Preservative Mixture (PPM [™]), Plant Cell Technology, USA, cena 1 ml ok. 10 zł	[5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0,135%, 2-methyl-3(H)-isothiazolone 0,0412% + sorbinian potasu i benzoetan sodu], pH 3,8	w kulturach roślinnych grzybo- i bakteriobójczy dla każdego stadium rozwoju, także dla endobiontów. Raczej zapobiega niż zwalcza. Nieskuteczny przy dużej liczbie mikroorganizmów	0,05-0,2% dodatek do pożywki, do odkażania inicjalnego 4-5%	uszkadza przebieg cyklu Krebsa i przerywa łańcuch transportu elektronów	przed autoklawowaniem lub po autoklawowaniu	stwierdzona tylko dla <i>Arabidopsis</i> i mszaków
Vitrofur (G-1), CBQ Kuba, cena 1 ml ok. 0,05 zł	1-(5-bromo-2-fur-2il)-2-bromo-2-nitroetene, furfural izolowany z trzciny cukrowej	w kulturach roślinnych zapobiega zakażeniom bakterijskim i grzybowym	35 mg/l		po autoklawowaniu lub bez autoklawowania	nietoksyczny dla banana, ananasa, chryzantemy, tytoniu
ProClin [®] , Rohm & Haas, USA, cena 1 ml 2-5 zł	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one i 2-methyl-4-isothiazolin-3-one + zmodyfikowany glikol i alkyl carboksylate	zapobiega kontaminacjom odczynników chemicznych i produktów spożywczych	6-20 ppm czynnych substancji (0,02-0,07%) preparatu	penetruje membrany i hamuje wzrost i oddychanie (hamuje aktywność enzymów w cyklu Krebsa, obniża poziom energii w komórce, hamuje metabolizm makrocząsteczek)	po autoklawowaniu (< 55°C)	nietoksyczny dla jabłoni, chryzantemy, gerbery, hosty, maliny

1	2	3	4	5	6	7
Biosept 33 SL, Cintamani, Polska, cena 1 ml ok. 0,50 zł	wyciąg z nasion grejfruta; zawiera katechiny, epikatechiny, apokatechiny, procyjanidyny i inne polifenole	skuteczny przeciwko bakteriom (szczególnie dla Gram +) i grzybom; środek dezynfekujący, zapobiegający zakażeniom w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, środek biobójczy w ochronie roślin, w medycynie alternatywnej; w kulturach roślinnych <i>in vitro</i> notowany, jako czynnik stymulujący metabolizm chitynazy/glukanazy, zwiększających odporność na infekcje grzybowe	2-8 ml/l	rozrywa membrany bakteryjne i uwalnia cytoplazmę w ciągu 15 min	przed autoklawowaniem	nietoksyczny dla jabłoni, chryzantemy, gerbery, hosty, maliny i truskawki
Dekaben C, Jan Dekker, Holandia, cena 1 ml ok. 0,50 zł; występuje w różnych formach i spektrum biobójczym: Dekaben C – szerokie spektrum i najszerszej stosowany, Dekaben IU i IT szczególnie polecany jako przeciwbakteryjny	fenoksyetanol, metyl-, etyl-, butyl-, izobutyl-, propylparaben	zapobiega kontaminacjom bakteryjnym i grzybowym kosmetyków	ogranicza wzrost <i>Pseudomonas putida</i> w stężeniu 2 i 4%		przed autoklawowaniem	nietoksyczny dla gerbery, toksyczny dla jabłoni, maliny, hosty i truskawki

1	2	3	4	5	6	7
Azotan srebra, cena 1 ml – 0,05-0,1 zł	nieorganiczny związek srebra	przeciw wszystkim rodzajom bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków	5-10 mg/l	degradacja membran cytoplazmatycznych, DNA traci zdolność replikacji, białka są inaktywowane	po autoklawowaniu jest neutralizowany przez związki z grupą tiolową (np. L-cysteina)	może ingerować w bilans regulatorów wzrostu (hamuje wpływ etylenu na eksplantaty roślinne)
Dichlorozocjanuron (NaDCC) 10 mg = 0,05 zł	organiczny związek chloru	dezynfekcja materiału roślinnego	100-500 mg/l	silny utleniacz	trwały w postaci stałej, w zamkniętym opakowaniu w temp. 25°C. Trwałość w roztworze wodnym wysoka; czas podtrwania 45 dni; trwałość spada ze wzrostem temperatury	uszkodzenia mniejsze niż przy podchlorynie wapnia; nieco opóźniony rozwój wierzchołków; uszkodzane głównie miejscą cięcia i najstarsze liście
Podchloryn sodu (NaClO)	nieorganiczny związek chloru	dezynfekcja materiału roślinnego	0,01% – odfekanie powierzchniowe, 0,0005% – dodatek do pożywki	silny utleniacz	nietrwały	uszkadza części zewnętrzne eksplantatów

chodzenia roślinnego (opracowanym i produkowanym na Kubie), i ponoć powszechnie stosowanym w kulturach roślinnych w krajach Ameryki Południowej.

W poszukiwaniu środka pomocnego w ograniczaniu bakterii w mnożących się kulturach warto wypróbować wyciąg z nasion grejpfruta, sprzedawany w Polsce pod nazwą Biosept 33SL. Środek ten jest polecany, jako dość wszechstronny biocyd wobec mikroorganizmów i owadów, a także środek o działaniu przeciwrakowym (54). W Polsce jest polecany do ochrony niektórych gatunków roślin przeciwko chorobom grzybowym (55). W naszych doświadczeniach okazał się obiecujący, ponieważ w stężeniach bakteriobójczych (0,5 i 1%) nie był toksyczny dla eksplantatów gerbery, chryzantemy, maliny, jabłoni i hosty (dane nie publikowane).

Do preparatów bakteriobójczych, przydatnych w zastosowaniu do kultur roślinnych *in vitro*, można zaliczyć różne środki przeciwbakteryjne stosowane w medycynie, kosmetologii i konserwacji żywności, np. różne formy Dekabenu oraz ProClin®300, pod warunkiem sprawdzenia ich fitotoksyczności w odniesieniu do rodzajów i gatunków rozmnażanych *in vitro*. Na przykład, w naszych doświadczeniach, ProClin®300 nie był fitotoksyczny dla pięciu rodzajów wymienionych roślin, a inny preparat, Triclosan, stosowany jako dodatek do kosmetyków (56), zabijał wszystkie badane kultury roślinne, natomiast Dekaben C nie był toksyczny tylko dla kultur gerbery (dane nie publikowane).

Biocydy, używane w medycynie i produktach kosmetycznych do zapobiegania i ograniczania zanieczyszczeń mikrobiologicznych, w odróżnieniu od wielu antybiotyków są mniej specyficzne, a zatem zwalczają szersze spektrum mikroorganizmów (57). Są one na ogół mniej fitotoksyczne od antybiotyków i mogą być stosowane przez cały okres prowadzenia kultury, także w bioreaktorach. Pojawiło się jednak doniesienie, że współdziałając z roślinnymi fitoaleksynami mogą powodować efekt fitotoksyczny, co stwierdzono w stosunku do *Arabidopsis* (58) i mszaków (59). Przy dłuższym okresie stosowania, mogą także stymulować niektóre mikroorganizmy do wytwarzania szczepów opornych (13,59,60).

Specjalnej uwagi wymaga likwidacja kultur roślinnych zanieczyszczonych bakteriami tworzącymi endospory. Autoklawowanie szkła zanieczyszczonego bakteriami należy wykonywać dwukrotnie (61).

Bakterie i grzyby mogą być rozwlekane w kulturach roślinnych przez przedziorki i wciornastki, z którymi należy walczyć, stosując gazowanie pomieszczeń odpowiednimi preparatami. West i Preece (62) podają, że skuteczną metodą „ratowania” kultur *Hibiscus moscheutos* zasiedlonych przez roztocze, było zamykanie 1-węzłowych odcinków pędów w otoczkę z alginianu sodu, sporządzonej na bazie pożywki roślinnej z dodatkiem fungicydu Benlate (benzimidazol) i środka przedziorkobójczego Orthene®.

4. Diagnostyka – wykrywanie i identyfikacja zanieczyszczeń bakteryjnych

Proces inicjacji kultury *in vitro* i dalsze etapy mikrorozmnażania, powinny obejmować możliwość zastosowania sposobów ujawniania obecności bakterii w tkankach eksplantatów, a w uporczywych przypadkach ich identyfikacji. Omówienie wszystkich metod, które mogą być stosowane do wykrywania i identyfikacji zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* przekracza zakres tego artykułu. Można w tym celu oprzeć się na opracowaniu Stead i wsp. (63). W ostatnim dziesięcioleciu opisano wiele ulepszeń wymienionych tam metod i technik, jednak dotyczą one na ogół identyfikacji bakterii zagrażających człowiekowi i zwierzętom. Dla tych mikroorganizmów i dla bakteryjnych patogenów roślinnych opracowano testy masowe, często zaawansowane technologicznie. Omawiane tu bakterie towarzyszące roślinom nie były przedmiotem takich opracowań.

Najłatwiejsze do wykrycia są bakterie zdolne do wzrostu na pożywkach roślinnych. Wzrostowi i ujawnianiu bakterii sprzyja dodatek do pożywki azotu organicznego. Dla bakterii nie rosnących na pożywkach roślinnych należy stosować pożywki bakteriologiczne, poczynając od tych najbardziej uniwersalnych, jak Agar odżywczy (Nutrient Agar – NA), Bulion odżywczy (Nutrient Broth – NB) lub Agar tryptonowo-sojowy (Tryptic Soya Agar – TSA) (64) aż do specjalistycznych, np. dla rodzaju *Pseudomonas* (65), *Methylobacterium* (66-67), 20E – ubogi agar dla *Rhizobiaceae* (68), Rozcieńczony bulion odżywczy (Diluted Nutrient Broth) (69), pożywki dla bakterii Gram- (70) lub R2A (71). Viss i wsp. (20) opracowali pożywkę 523 do detekcji bakterii endogennych zasiedlających rośliny drzewiaste. Najczęstszym sposobem indeksowania jest wykładanie na wymienione pożywki bakteryjne dolnych odcinków pędów lub liści i/lub płynu spod eksplantatów lub też umieszczanie ich w bakteryjnych pożywkach płynnych, gdzie istnieje możliwość wyflukania bakterii. Innym sposobem jest homogenizowanie tkanek, rozcieńczanie homogenatu w 0,85% NaCl i posiew na pożywki. Kultury bakteryjne powinny być inkubowane w różnych temperaturach oraz w ciemności i na świetle, a w przypadku bakterii wolno rosnących czas inkubacji powinien być przedłużony do czternastu, a nawet trzydziestu dni. Wiedza na temat bakterii endogennych wskazuje na potrzebę dużej pomysłowości w stwarzaniu bakteriom środowiska, w którym mogłyby się ujawnić, w wyniku intensywne go namnażania. Najbardziej tradycyjne i absolutnie niezbędne postępowanie podał Thomas (72). Obejmuje ono trójstopniowe indeksowanie, polegające na ocenie wizualnej badanych eksplantatów i sprawdzeniu każdego przypadku nietypowego wzrostu i morfologii oraz występowania nekroz, posiewu pożywki spod eksplantatów nie wykazujących zanieczyszczeń oraz indeksowanie fragmentów eksplantatów, na przynajmniej dwóch pożywkach – Bulion odżywczy i 523. Bakterie mogą wymagać specyficznych warunków do namnażania. Panicker i wsp. (73) donosili, że różne morfotypy endofitu *Curtobacterium citreum* ujawniały się na pożywce do namnażania chryzantemy tym obficie, im większe było stężenie cytokininy, ale tylko w obecności tkanek roślinnych, co także należy rozważyć przy wykrywaniu za-

nieczyszczeń. W przypadku podejrzenia obecności bakterii metylotroficznych należy stosować indeksujące pożywki zawierające metanol, jako źródło węgla. Wykrywanie wszystkich bakterii można prowadzić w mikroskopie świetlnym w kontraście fazowym lub po barwieniu negatywnym oraz w mikroskopie elektronowym transmisyjnym (74).

Obecność DNA bakteryjnego można wykazać w reakcji łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *Polimerase Chain Reaction*), stosując startery uniwersalne do genów podjednostki rybosomalnej 16S rRNA (75,76) lub specyficzne dla bakterii najczęściej występujących w kulturach, jak *Bacillus* (77), *Pseudomonas* (78), *Xanthomonas* (79), *Methylobacterium* (74,80,81).

Markery DNA są przydatne do wykrywania obecności bakterii nie dających się hodować na pożywkach bakteryjnych. Obecność żywych bakterii może być wykryta na podstawie obecności mRNA bakteryjnego, przez zastosowanie technik odwrotnej transkrypcji wraz z łańcuchową reakcją polimerazy (RT-PCR, ang. *Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*) (22). Metoda RT-PCR powinna być także stosowana dla oceny skuteczności odkażania. Przez zastosowanie tylko techniki PCR można otrzymać wynik fałszywie pozytywny z powodu dużej trwałości DNA.

Istotną cechą zanieczyszczeń bakteriami kultur roślinnych jest ich różnorodność, także w jednym eksplancie (74). Detekcja DNA bakteryjnego starterami niespecyficznymi (75) nie da wskazówek odnośnie do ich przynależności gatunkowej, co jest ważne, ponieważ znając gatunek, można wytypować prawdopodobne źródło zanieczyszczeń – wniesienie z eksplantatem roślinnym lub z powietrza w laboratorium, złej pracy autoklawu lub rozsiewania przez personel. Określenie przynależności rodzajowej, a zwłaszcza gatunkowej, może być trudne przy zastosowaniu metod mikrobiologicznych, opisanych przez Bradbury (82). Należy raczej poszukać pomocy w specjalistycznych laboratoriach mikrobiologicznych, gdzie powszechnym sposobem staje się identyfikacja na bazie sekwencji DNA, otrzymanego z czystych kultur bakterii. Müller i Döring (17) dla zidentyfikowania różnych gatunków bakterii w jednym eksplancie zastosowali technikę pobierania z tkanek pojedynczych kolonii przy użyciu mikromanipulatora 3D i zastosowaniu techniki izotermalnego powielania DNA. Dzięki tej metodzie można otrzymać dający się obserwować produkt amplifikacji na bazie niewielkiej liczby kopii matrycy.

W detekcji molekularnej istotna jest czułość metody. Amplifikacja DNA metodą reakcji łańcuchowej (PCR) jest bardziej czuła niż techniki immunologiczne, ale amplifikacja z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (RT-PCR, ang. *Real Time-PCR*) jest 100 × bardziej czuła (83). Ostatnio rozwijane techniki detekcji patogenów zapewniają dalsze zwiększenie czułości detekcji (84). Dla przykładu, technika oparta na nanocząsteczkach krzemu, skoniugowanych z przeciwciałami dla bakterii i dających silny sygnał fluorescencyjny, pozwala na wykrycie pojedynczych komórek bakteryjnych (85). Zaawansowane techniki detekcji i identyfikacji mogą być obecnie stosowane do bakterii szczególnie groźnych dla życia i zdrowia, w kontroli żywności, wody, diagnostyki klinicznej i terapii oraz w przypadkach aktów bioterroryzmu.

5. Podsumowanie

Powszechne występowanie bakterii w każdym środowisku powoduje, że nawet największa staranność w procedurze mikrorozmnażania roślin nie daje pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Najważniejszy jest etap inicjacji kultury, podczas którego można wprowadzić bakterie endogenne zasiedlające tkanki roślinne, które mogą ujawniać się dopiero po wielu miesiącach pasażowania. Obecność bakterii w tkankach roślin ma ogromne znaczenie, nawet, jeśli nie rozmnażają się masowo i nie wydostają się do pożywki. Biorąc udział w metabolizmie rośliny tworzą jakby nowy organizm, o odrębnych wymaganiach co do składników pożywki. Całkowicie uwolnione od bakterii eksplantaty mogą mieć zupełnie inne wymagania niż zanieczyszczone. Zróżnicowane i nieprzewidywalne bakteryjne zanieczyszczenia wewnętrzne, nie pozwalają często na wystandaryzowanie procedur, są także powodem braku powtarzalności wyników w poszczególnych laboratoriach, jak i pomiędzy laboratoriami. Problem ten zostanie przezwyciężony, wtedy gdy będzie możliwe stosowanie odkażania za pomocą związków lub preparatów wybiórczo eliminujących bakterie endogenne, bez niszczenia tkanek rośliny.

Opanowanie zanieczyszczeń wchodzących do kultur roślinnych *in vitro* ze środowiska laboratoryjnego jest znacznie łatwiejsze przy zachowaniu restrykcyjnych procedur wykonywania pożywek, pasażowania kultur, monitorowania czystości powietrza i kultur. W przypadku stwierdzenia zanieczyszczeń można dodać do pożywek sprawdzone eksperymentalnie biocydy, które zahamują namnażanie bakterii.

W czasie ostatniej dekady dokonał się ogromny postęp w dziedzinie techniki detekcji i identyfikacji bakterii, szczególnie w zakresie markerów molekularnych i biosensorów, co pozwala na posłużenie się zestawami diagnostycznymi. Nie dotyczy to jednak bakterii zanieczyszczających kultury roślinne, dlatego w przypadku konieczności zdiagnozowania gatunku bakterii należy korzystać z procedur ogólnych i identyfikacji na podstawie sekwencji DNA.

Praca zrealizowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2 PO6A 026 30.

Literatura

1. Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J., (2001), *Cur. Opin. in Plant Biol.*, 4, 343-350.
2. Danhorn T., Fuqua C., (2007), *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 401-422.
3. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D., (2008), *Trends in Microbiol.*, 16, 463-471.
4. Long H. H., Schmidt D. D., Baldwin I. T., (2008), *PLoS ONE*, 3, e2702.
5. Berg G., (2009), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 11-18.
6. Murthy B. M. S., Vettakkorumakankav N. N., KrishnaRaj, Odumeru J., Saxena P. K., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 607-613.
7. Mirza M. S., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P., Malik K. A., (2001), *Plant and Soil*, 237, 47-54.
8. Thomas P., (2004b), *J. Appl. Microbiol.*, 97, 114-123.
9. Orlikowska T., Zawadzka M., (2006), *Biotechnologia*, 4 (75), 72-85.

10. Ulrich K., Stauber T., Ewald D., (2008), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 93, 347-351.
11. Scherling Ch., Ulrich K., Ewald D., Weckwerth W., (2009), *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 1032-1037.
12. Thomas P., Prabhakara B. S., Pitchaimuthu M., (2006), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 85, 317-329.
13. Gilbert P., Allison D. G., McBain A. J., (2002), *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.*, 92, 98S-110S.
14. Pereira M. O., Machado I., Simoes M., Vieira M. J., (2007), *Biofilm Club*, 2007, 167-174, (<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/7534/1/167-174%5B1%5D.pdf>).
15. Thakur R., Sood A., (2006), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 84, 369-371.
16. Pirttilä A. M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A., (2000), *Appl. Environm. Microbiol.*, 66, 3073-3077.
17. Müller P., Döring M., (2009), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 98, 35-45.
18. Thomas P., Swarna G. K., Patil P., Rawal R. D., (2008), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 93, 39-54.
19. Thomas P., Swarna G. K., Roy P. K., Patil P., (2008), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 93, 55-63.
20. Viss P. R., Brooks E. M., Driver J. A. A., (1991), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 27P, 42.
21. Stevenson T., Eichorst S. A., Wertz J. T., Schmidt T. M., Breznak J. A., (2004), *Appl. Environm. Microbiol.*, 70, 4748-4755.
22. Dahm H., Strzelczyk E., (2004), *Post. Microbiol.*, 43, 251-265.
23. Thomas P., Kumari S., Swarna G. K., Prakash D. P., Dinesh M. R., (2007), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 26, 1491-1499.
24. Thomas P., Kumari S., Swarna G. K., Gowda T. K. S., (2007), *Can. J. Microbiol.*, 53, 380-390.
25. Parkinson M., Prendergast M., Sayegh A. J., (1996), *Plant Growth Regul.*, 20, 61-66.
26. Niedz R. P., Balsher M. G., (2002), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, 468-471.
27. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M. M., Atherton C., Michen M. M., Prendergast G., Rowntree J. K., (2006), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 206-214.
28. Bausher M. G., Niedz R. P., (1998), *Proc. Fla. Hort. Soc.*, 111, 260-263.
29. Kolozsvári Nagy J., Sule S., Sampaio J. P., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 520-524.
30. Ali N., Mulwa R. M. S., Norton M. A., Skirvin R. M., (2007), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 91, 205-208.
31. Sermsiri C., Todd J. J., Widholm J. M., (1996), *Plant Cell Rep.*, 16, 222-225.
32. Luna C., Collavino M., Sansberro P., Mroginski L., (2009), *Acta Hort.*, 812, 97-101.
33. Grum M., Camloh M., Rudolph K., Ravnikař M., (1998), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 52, 79-82.
34. Langens-Gerrits M., Alberts M., de Klerk G.-J., (1998), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 52, 75-77.
35. Abdi G., Salchi H., Khosh-Khui M., (2008), *Acta Physiol Plant.*, 30, 709-714.
36. Boine B., Naujoks G., Stauber T., (2008), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 94, 219-223.
37. Waegel A. S., (2003), *HortSci.*, 38, 565-567.
38. Traore A., Xing Z., Bonser A., Carlson J., (2005), *HortSci.*, 40, 1464-1468.
39. Chen W. L., Yeh D. M., (2007), *HortScience*, 42, 629-632.
40. Teixeira S. L., Ribeiro J. M., Teixeira M. T., (2006), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86, 375-378.
41. Ahmed E. U., Mizuta Y., Hayashi T., Yazawa S., (2004), *Bull. Exp. Farm, Kyoto Univ.*, 13, 1-9.
42. Fuller M. P., Pizzey T., (2001), *Acta Hort.*, 560, 567-570.
43. Rosenblueth M., Martinez L., Silva J., Martinez-Romero E., (2004), *Appl. Microbiol.*, 27, 27-35.
44. Rosenblueth M., Mertinez-Romero E., (2006), *MPMI*, 19, 827-837.
45. Guri A. Z., Patel K. N., (1998), *United States Patent* 5 750 402.
46. Compton M. E., Koch J. M., (2001), *In Vitro Cell. De. Bio.-Plant*, 37, 259-261.
47. Sharaf-Eldin M. A., Weathers P. J., (2006), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 553-557.
48. Davies R. L., Etris S. F., (1997), *Catalysis Today*, 36, 107-114.
49. Kubota C., Tadokoro N., (1999), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35, 296-298.
50. Orlikowska T., Kucharska D., Nowak E., Rojek Ź., (1996), *J. Appl. Genetics*, 37A, 123-125.
51. Orlikowska T., Nowak E., Marasek A., Kucharska D., (1999), *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, 59, 95-102.
52. Liao S. Y., Read D. C., Pugh W. J., Furr J. R., Russel A. D., (1997), *Lett. Applied Microbiol.*, 25, 279-283.
53. González-Olmedo J., Flndora Z., Molina L., Ablnodr J., Desjardings Y., Escalona M., (2005), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41, 87-90.

54. Tirillini B., (2000), *Fitoterapia*, 71, 829-837.
55. Orlikowski L., Skrzyżczak C., (2003), *Bull. Polish Acad. Sci. Biological Sciences*, 51, 79-85.
56. Ahn K. C., Zhao B., Chen J., Cherednichenko G., Sanmarti E., Denison M. S., Lasley B., Pessah I. N., Kultz D., Chang D. P. Y., Gee S. J., Hammock B. D., (2008), *Environ. Health Perspectives*, 116, 1203-1210.
57. Russel A. D., (2003), *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 794-803.
58. Paul M.-L., Semer C., Kucharek T., Ferl R. J., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 480-485.
59. Rowntree J. K., (2006), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 87, 191-201.
60. Chapman J. S., (2003), *Intern. Biodeterior. Biodegr.*, 51, 133-138.
61. Thomas P., (2006), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 87, 155-165.
62. West T. P., Preece J. E., (2006), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 301-304.
63. Stead D. E., Hennessy J., Wilson J., (1998), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 82, 17-25.
64. Schaad N. W., Jones J. B., Chun W., (2001), *hird ed., APS PRESS*.
65. Gould W. D., Hagedorn C., Bardinelli T. R., Zablutowicz R. M., (1985), *Appl. Environm. Microbiol.*, 49, 28-32.
66. Mathaiyan M., Poonguzhali S., Lee H. S., Hari K., Sundaram S. P., Sa T. M., (2005), *Biol. Fertil. Soils*, 41, 350-358.
67. Ivanova E., Doronina N., Trotsenko Y., (2007), *System. Appl. Microbiol.*, 30, 444-452.
68. Werner D., Wilcockson J., Zimmermann E., (1975), *Arch. Microbiol.*, 105, 27-32.
69. Mitsui H., Gorlach K., Lee H.-J., Hattori R., Hattori T., (1997), *J. Microbiol. Methods*, 30, 103-110.
70. Moore J. E., Xu J., Millar B. C., Elborn J. S., (2003), *J. Appl. Microbiol.*, 95, 160-166.
71. Ulrich K., Ulrich A., Ewald D., (2008), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 63, 169-180.
72. Thomas P., (2004), *Cur. Sci.*, 87, 67-72.
73. Panicker B., Thomas P., Janakiram T., Venugopalan R., Narayanappa S. B., (2007), *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 43, 614-622.
74. Pirttilä A. M., Podolich O., Koskimäki J. J., Hohtola E., Hohtola A., (2008), *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 95, 47-55.
75. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 697-703.
76. Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J., Wade W. G., (1998), *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 795-799.
77. Wu X.-Y., Walker M. J., Hornitzky M., Chin J., (2006), *J. Microbiol. Methods*, 64, 107-119.
78. Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P. M., Watrud L. S., Di Giovanni G. D., (1998), *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 2545-2553.
79. Cubero J., Graham J. H., (2002), *Appl. Environm. Microbiol.*, 68, 1257-1264.
80. Gullede J., Ahmad A., Steudler P. A., Pomerantz W. J., Cavanaugh C. M., (2001), *Appl. Environm. Microbiol.*, 67, 4726-4733.
81. Lacava P. T., Li W. B., Araújo W. L., Azevedo J. L., Hartung J. S., (2006), *J. Microbiol. Methods*, 65, 535-541.
82. Bradbury J. F., (1988), *Acta Horticulturae*, 225, 27-37.
83. Minardi D., Moretti M., Li Y., Gaggero L., Garibaldi A., Gullino M. L., (2008), *Eur. J. Plant Pathol.*, 122, 227-237.
84. Lazcka O., Del Campo F. J., Muñoz F. X., (2007), *Biosensors a. Bioelectronics*, 22, 1205-1217.
85. Zhao X., Hilliard L. R., Mechery S. J., Wang Y., Bagwe R. P., Jin S., Tan W., (2004), *PNAS*, 101, 15-027-15032.