



Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*

Teresa Orlikowska, Marta Zawadzka
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

Bacteria in plant tissue cultures

Summary

Bacterial contamination is quite frequent in plant tissue cultures although, theoretically, cultures have to be axenic. It is their ubiquity and adaptability to different conditions that enable bacteria to colonize also tissue cultures. Among them there are not only the typical endo- and egzophytic species connected with the plant kingdom, but also those which are common among people. The bacteria species isolated from plant tissue cultures were found to be vitropathogenic (pathogens facultative to *in vitro* explants), latent (pathogens not virulent *in vitro*), and cryptic (present in tissues but invisible). Some bacteria produce growth regulators, which can modify the morphogenetic mode of explants. They are all undesirable ones in cultures, but the explants contaminated with pathogenic species should be eliminated obligatorily. Various groups of bacteria, as well as the techniques of detecting, identifying and eliminating them, are briefly described.

Key words:

bacterial contamination, decontamination, detection, identification, *in vitro* cultures, vitropathy.

Adres do korespondencji

Teresa Orlikowska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice;
e-mail:
teresa.orlikowska@insad.pl

biotechnologia

4 (75) 64–77 2006

1. Wstęp

Na upowszechnienie techniki roślinnych kultur *in vitro* złożyły się trzy czynniki: poznanie zasad żywienia mineralnego roślin i skomponowanie dobrze zbilansowanych pożywek, poznanie znaczenia i zasad stosowania regulatorów wzrostu i możliwość stosowania sterylnych warunków kultury. Brak mikroorganizmów w kulturach jest uważany za jeden z wyznaczników tej techniki badawczej i produkcyjnej. Poprzez powierzchniowe

i wewnętrzne odkażanie eksplantatów inicjalnych można wyeliminować większość grzybów i bakterii. Inicjacja kultury z merystemów lub możliwie małych wierzchołków wzrostu, pozwala na pozbycie się wirusów i fitoplazm. Odkażanie naczyń i pożywek w warunkach nasyconej pary wodnej oraz praca pod kamerami z nawiewem powietrza oczyszczanego filtrami zatrzymującymi komórki bakteryjne i grzybowe, wreszcie sterylizacja narzędzi w temperaturze powyżej 200°C powinny teoretycznie umożliwić otrzymywanie sterylnych mikrosadzonek, kalusa lub regenerujących eksplantatów. Jednak z czasem okazało się, że pomimo to kultury bywały zasiedlone przez bakterie. W kilkanaście lat po zastosowaniu techniki kultur do produkcji mikrosadzonek, zaczęto publicznie dyskutować problem zakażeń w warunkach *in vitro* (1,2).

Rośliny są w warunkach naturalnych zasiedlone licznymi mikroorganizmami. Bakterie znajdują się na powierzchni, w tkance przewodzącej, w przestrzeniach międzykomórkowych, a także wewnątrz komórek (3). Część z nich jest patogenami roślin, nadmiernie się rozmnaża, niszczy komórki, wydziela substancje toksyczne. Większość bakterii to endo- lub egzofity, które współżyją z rośliną nie wyrządzając jej szkody, nie indukując reakcji nadwrażliwości ani objawów chorobowych. Zazwyczaj te bakterie nie rozmnażają się do takiej liczby jak patogeniczne; zajmują specyficzne nisze, otaczając się często zabezpieczeniami w postaci śluzów (4,5). Bakterie korzystają ze środowiska stworzonego przez roślinę. Niektóre bakterie pełnią funkcję „sprzątaczy” szkodliwych metabolitów roślinnych, np. etanolu. Jeśli takie bakterie rozmnożą się w kulturach *in vitro* mogą pełnić funkcję pożyteczną (6). Niektóre szczepy bakterii należących do rodzajów *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* i *Azospirillum* wytwarzają regulatory wzrostu – etylen, auksyny i cytokiny (7,8), inne degradują regulator wzrostu tidiazuron (9), co może modyfikować wzrost i rozwój roślin, także eksplantatów *in vitro*. *Agrobacterium* (10) zmienia informację genetyczną komórek roślinnych, wskutek czego wytwarzają one regulatory wzrostu modyfikujące potencjał morfogenetyczny tkanek. Zarówno obecność bakterii patogenicznych jak i nie patogenicznych, a nawet pożytecznych jest w kulturach roślinnych niepożądana. Należy zastosować wszystkie możliwe sposoby, aby nie wprowadzać bakterii z materiałem roślinnym, a następnie zabezpieczyć kultury przed zasiedleniem przez bakterie różnego pochodzenia. Szczególnie istotny jest problem obecności bakterii w kulturach wieloletnich (11-15).

W latach 1988 i 1996 odbyły się w Cork (Irlandia) międzynarodowe konferencje poświęcone problemom zakażeń w kulturach *in vitro*, a w roku 1999, w tym samym miejscu, konferencja na temat problemów jakości związanych z produkcją roślin *in vitro*, gdzie tematyce zakażeń w kulturach poświęcono oddzielną sesję. Temat ten jest poruszany właściwie na każdej konferencji dotyczącej kultur roślinnych *in vitro*. Pomimo ogromnego postępu w technikach wykrywania i identyfikacji bakterii, problem nie znika, o czym świadczą wciąż drukowane publikacje naukowe o wykrywaniu bakterii w kulturach i bardziej lub mniej udanych próbach ich eliminacji. Bakterie są organizmami o bardzo dużej zdolności przystosowawczej. Znajdują się one

zarówno w środowisku gdzie rosły rośliny donorowe jak i w środowisku laboratoryjnym. Część tych bakterii może zasiedlać kultury *in vitro*. Bakterie te są określane jako bakterie towarzyszące, utajone (ang. *covert*), latentne, saprofityczne, endo- i egzofityczne, patogeniczne i witropatyczne.

Spektrum bakterii wnoszonych z eksplantatami inicjalnymi jest bardzo szerokie. Stwierdzono obecność, m. in. *Agrobacterium radiobacter*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes dinitrificans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *E. agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Flavobacterium* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. luteola*, *P. paucimobilis*, *P. putida*, *Ralstonia aquatilis*, *Serratia plymutica*. W grupie tej dominują bakterie G (-). Z kultur starszych niż 12-miesięczne izolowano, m.in. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus circulans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Erwinia*, *Micrococcus kristinae*, *M. varians*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *Pseudomonas maltophilia*, *P. paucimobilis*, *Staphylococcus epidermis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, z których ok. 75% należy do grupy G (+) (16,17). O rozmiarach problemu mogą świadczyć wyniki badań Leifert i wsp. (17), którzy zidentyfikowali 293 szczepy bakteryjne w kulturach pochodzących z dwóch komercyjnych laboratoriów. Wśród nich przedstawiciele rodzajów *Staphylococcus* i *Micrococcus* stanowili 26%, *Pseudomonas* 19%, *Bacillus* 13%, *Enterobacter* lub *Erwinia* 12%, *Lactobacillus* 11%, *Agrobacterium* i *Acinetobacter* po 3%. Reby (18), analizując zakażenia, które wystąpiły w bardzo zróżnicowanym gatunkowo materiale roślinnym w kulturach *in vitro*, zidentyfikowała 20 rodzajów bakterii, których na ogół nie można było przyporządkować do określonego gatunku rośliny. Autorka stwierdziła także zakażenia mieszane różnymi rodzajami bakterii. W kulturach tkankowych mogą także występować fitoplazmy (klasa *Mollicutes*), najmniejsze, samodzielnie replikujące się organizmy prokariotyczne, otoczone jedynie błoną cytoplazmatyczną (19).

Przedmiotem tego opracowania jest, sporządzona na bazie literatury, także z ostatnich lat, krótka charakterystyka grup bakterii izolowanych z kultur roślinnych *in vitro*, metod ich identyfikacji i detekcji oraz strategia eliminacji lub przynajmniej ograniczania wielkości populacji bakterii w kulturach roślinnych.

2. Różnorodność bakterii i ich wpływ na kultury tkanek roślinnych *in vitro*

2.1. Bakterie patogeniczne

Do tej pory zidentyfikowano ponad 30 rodzajów bakterii, w tym fitoplazm, w kulturach roślin *in vitro*. Część z nich, to bakterie znane jako patogeny określonych rodzajów i gatunków roślin. Mnożenie roślin w warunkach *in vitro* jest narzędziem do otrzymywania materiału nasadzeniowego wolnego od patogenów, w tym bakteryjnych. Postępowanie w tym przypadku obejmuje zainicjowanie kultu-

ry z wytypowanych roślin wolnych od patogenów. Jeżeli nie jest to możliwe, kultury inicjuje się z merystemów wierzchołkowych izolowanych z szybko rosnących pędów po chemo- lub termoterapii. Testowanie na obecność patogena należy wykonać kilkakrotnie: w inicjalnym stadium, okresowo w czasie namnażania oraz materiału wysadzonego do szklarni. Taka procedura była opisana w odniesieniu do *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (20,21), *Erwinia chrysanthemii* pv. *dieffenbachiae* (22), *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* na anturium (23), *Erwinia* sp. na ziemniaku (24). Bakterie patogeniczne mogą bytować w sposób bezobjawowy (infekcja latentna), jak np. *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* w kulturach anturium (23), *Xanthomonas begoniae* (Hakkart i Versluis, cyt. za 23), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* lub *Erwinia carotovora* w kulturach ziemniaka (Schul i wsp., cyt. za 23,25, Weber i wsp., cyt. za 26). Bakterie te wywołują objawy chorobowe na roślinach na ogół dopiero po przeniesieniu do środowiska uprawowego. Bezobjawowy sposób bytowania jest związany z tym, że warunki w kulturach *in vitro* (wysoka wartość osmotyczna pożywki i wysokie stężenie sacharozy) zazwyczaj nie sprzyjają rozmnażaniu bakterii i produkcji czynników warunkujących patogeniczność. Wówczas gdy warunki zmieniają się na korzystniejsze dla bakterii lub bardziej stresujące dla tkanek roślinnych, bakterie zaczynają się rozmnażać intensywnie i stają się widoczne w pożywce i/lub na tkankach roślinnych. Dotyczy to, np. zmian temperatury (wzrost powyżej 30°C), podwyższenia wartości pH (26) lub zmian w bilansie hormonalnym, np. w przypadku *Xanthomonas pelargonii* po przeniesieniu do pożywki bez cytokininy (21). Bakterie, nie uznane do tej pory za patogeny, mogą rozpocząć wytwarzanie czynników warunkujących patogenezę w wyniku zmiany warunków środowiska, osłabienia odporności tkanek roślinnych, rozmnożeniu się do odpowiedniego poziomu (tzw. sygnalizator zagęszczenia, ang. *quorum sensing*) lub przy braku konkurencji ze strony innych mikroorganizmów (2). Upowszechnia się tendencja, aby produkcja sadzonek w laboratoriach *in vitro* była certyfikowana (27), co wymaga stosowania procedur pozwalających na wykrycie patogena, zalecanych przez EPPO (ang. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*), a organizacja produkcji odbywała się według wytycznych HACCP, ang. *Hazard Analysis and Critical Control Point* (26-30), co zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania materiału nasadzeniowego bez szkodliwych mikroorganizmów.

2.2. Bakterie neutralne i wywołujące witropacie

Większość bakterii spotykanych w kulturach roślin *in vitro*, to mikroorganizmy współżyjące z rośliną, nie powodujące patogenezę. Część bakterii można zakwalifikować do saprobiontów bytujących na roślinach, w glebie i na ciele ludzkim, odżywiających się substancją organiczną z obumarłych komórek, które często rozmnażają się intensywnie i stają widoczne w starzejących się kulturach. W rezultacie masowego rozmnożenia, bakterie te mogą obniżyć wydajność namnażania, ukorzenia-

nia lub regeneracji przybyszowej. Takie oddziaływanie nazwano witropatią (8). Dla przykładu, do bakterii witropatycznych w kulturach podkładki jabłoni M9 zaliczono izolaty z rodzajów *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Actinomycetes* (31). *Lactobacillus plantarum* (używana w procesie konserwowania żywności) okazała się witropatogennym dla kultur *Hemerocallis*. Produkowany przez nią kwas DL-mlekowy zabijał kultury w ciągu piętnastu tygodni, a początkowymi objawami infekcji była postępująca chloroza liści, zmiana barwy kalusa na szary oraz obniżający się współczynnik mnożenia pędów (32). Endofityczne bakterie – *Pasteurella multocida*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Alcaligenes* sp. były przyczyną nekrozy wierzchołków liści w kulturach pędowych limonium (33). Przyczyną witropatii może być oddziaływanie na eksplantaty roślinne takich metabolitów bakteryjnych, jak antybiotyki, cyjanek, metanol (16,17,32,34-36).

2.3. Bakterie ingerujące w bilans hormonalny roślin

Obecność niektórych bakterii w kulturach *in vitro* w widoczny sposób wpływa na zmiany rozwojowe roślin. Dla przykładu, bakteria *Bacillus pumilus* przyspieszała ukorzenianie *in vitro* mikrosadzonek winorośli i w konsekwencji sprzyjała wzrostowi pędów (37). Autor nie określił przyczyny modyfikacji, ale sugerował podobieństwo do działania *B. putida*, która stymuluje ukorzenianie dzięki wytwarzaniu IAA (38). Lepsze ukorzenianie różnych roślin, m.in. sekwoi (39), sosny (40) i słonecznika (41) zaobserwowano w wyniku inokulowania podstawy mikrosadzonek kulturami *A. rhizogenes*. Burns i Schwarz (42) stwierdzili obecność w kulturach niezidentyfikowanej bakterii, która sprzyjała ukorzenianiu podliścieniowych eksplantatów *Pinus elliotii*, jednak w inny sposób niż *A. rhizogenes*. Stymulację organogenezy u *Spathiphyllum* i *Anthurium*, prawdopodobnie przez zmianę spektrum gibereliny, powodowała obecność *Rhodococcus fascians* (43). Okazało się, że bakterie z tego gatunku wytwarzają rodestrynę, która wykazuje aktywność słabej auksyny (44). Bakteria *Bacillus circulans* stymulowała wytwarzanie zarodków somatycznych *Pelargonium x hortorum* (45). Szczep *Pseudomonas* sp. wyizolowany z *Origanum vulgare* redukował nadmierne uwodnienie i stymulował wzrost pędów w kulturach maliny (46). Inny szczep *Pseudomonas* zwiększał liczbę korzeni, suchą masę korzeni i rozłogów i wysokość pędów ziemniaka (47). Morfogeniczny efekt dzikich szczepów *Agrobacterium tumefaciens* obserwowano w postaci zwiększonej aktywności w tworzeniu pędów (48). Szczepy *Methylobacterium mezophilicum* symulowały efekt cytokininy w kulturach splątków mchu *Funaria* (49). *Methylobacterium* sp. i *Methylophilus glucoseoxidans* stymulowały tworzenie morfogenicznego kalusa oraz lepsze wyrastanie zregenerowanych roślin pszenicy (50). Stwierdzono, że bakterie z rodzaju *Methylobacterium* wytwarzają zeatynę (51). Fitoplazma żółtaczkii astra powodowała tworzenie dużej liczby drobnych pędów kątowych *Limonium sinuatum* na pożywce bez cytokininy (52). Niektóre patowary *Pseudomonas syringae* wytwarzają etylen (53), który może mieć w kulturach wpływ na morfogenezę.

2.4. Bakterie endo- i egzofityczne

Hallmann i wsp. (7) jako endofity określają bakterie niepatogeniczne, nie powodujące istotnych szkód, które są izolowane lub ekstrahowane z roślin po ich powierzchniowym odkażeniu. Przemieszczają się one zarówno w ksylemie, jak też aktywnie penetrując tkanki roślinne z pomocą enzymów hydrolitycznych, celulaz i pektynaz. Należą tu bakterie z różnych grup systematycznych. Mogą one pozostawać w stanie utajonym, jak też aktywnie kolonizować tkanki. Bakterie te mogą przenosić się przez nasiona, materiał rozmnażany wegetatywnie, a do wnętrza tkanek wnikać z gleby okołokorzeniowej i z fylosfery przez aparaty szparkowe, komórki gruczołowe, skaleczenia, włoski i naturalne pęknięcia związane ze wzrostem i rozwojem rośliny. Najczęściej bakterie zasiedlają przestrzenie międzykomórkowe, rzadziej wnętrza komórek (3). Źródłem pożywienia są najczęściej wydzieliny komórkowe, rzadziej składniki ścian komórkowych.

Naturalnym środowiskiem bakterii egzofitycznych są zewnętrzne powierzchnie roślin. Do tej grupy należą zarówno bakterie patogeniczne jak i saprofity z różnych grup taksonomicznych (5,54). Jedne i drugie mogą egzystować w kulturach roślinnych. Są one teoretycznie łatwiejsze do usunięcia w procesie odkażania inicjalnych eksplantatów niż endofity, jednak sterylizacja może nie być skuteczna, ponieważ rozwinęły one strategie przystosowawcze, tworząc mikrośrodowisko o charakterze biofilmu, odporne na czynniki fizyczne i chemiczne (4,55). Niektóre bakterie zasiedlające fylosferę liści produkują witaminy B, auksyny i cytokininy (6). Inne bakterie wydzielają gumy, które poprawiają przyczepność i chronią je przed wysychaniem (56).

3. Metody identyfikacji i wykrywania bakterii w kulturach *in vitro*

3.1. Wykrywanie bakterii w pożywce i eksplantatach (indeksowanie)

O obecności bakterii w pożywce roślinnej świadczą zmętnienia i przebarwienia lub nacieki na powierzchni. Mogą one mieć różny kształt, kolor, powierzchnię i tempo wzrostu. Najczęściej objawem zasiedlenia tkanek jest zmętnienie pożywki pod eksplantatem (2). Niekiedy jedynym objawem jest wodniste halo wokół eksplantatu pojawiające się zaraz po wyszczepieniu (57). Bakterie PPFM (ang. *pink pigmentet facultative methylotrophs*) – różowo zabarwione metylotrofy fakultatywne (6), których najważniejszym przedstawicielem jest *Methylobacterium mesophilicum* były izolowane z ponad siedemdziesięciu gatunków roślin, także z wielu kultur tkankowych. Nie tworzą one kolonii na typowych pożywkach bakteryjnych, nawet przy wysokich stężeniach rzędu 10^8 j.t.k. (jednostek tworzących kolonie) na gram świeżej masy. Bakterie te nie ujawniają się także na pożywkach roślinnych. W starych kulturach kalusa

mogą być widoczne jako halo – przezroczysta otoczka. Można je natomiast wykryć na pożywkach bakteryjnych, w których jedynym źródłem węgla jest metanol (58).

Zazwyczaj zakażenia w kulturach roślinnych są wypadkową obecności więcej niż jednego gatunku bakterii (13,16-18,35,59-61). Dlatego najpierw należy wyizolować bakterie z pojedynczych kolonii na stałej pożywce bakteriologicznej, mikroskopowo ustalić kształt i wielkość komórek bakteryjnych oraz morfologię i rozmiary kolonii. Część bakterii dobrze rośnie na pożywkach stosowanych do namnażania i regeneracji kultur *in vitro*; np. bakteria *Bacillus subtilis* rozwija się na pożywce zawierającej ½ składników mineralnych Murashige i Skoog (16) i może być w związku z tym szybko wykryta po wprowadzeniu do kultur. W przypadku braku objawów obecności bakterii na pożywce roślinnej i eksplantatach, fragmenty tkanek i pożywki z okolicy eksplantatu należy wykładać na pożywkach specyficznych dla bakterii, np. YGC, PYA lub PYGA (62), KB, YDC, NGA, TSA (57), pożywka 523 opracowana specjalnie dla bakterii występujących w kulturach roślinnych *in vitro* (Viss i wsp., cyt. 63), i innych. Czasem zakażenie bakteryjne jest widoczne na eksplantatach, np. w postaci brązowego nalotu na ogonkach i blaszkach liściowych (26). Bakterie wprowadzone na tkankach roślinnych na ogół rosną lepiej w obecności tkanek roślinnych. Dla przykładu, *Pseudomonas maltophilia* i *Staphylococcus saprophyticus* rosną na pożywkach w obecności *Delphinium* (64). *Lactobacillus plantarum* i *Erwinia carotovora* do ujawnienia się w kulturach potrzebują tkanek roślinnych, np. *Hemerocallis* lub *Delphinium* (17), podobnie *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* nie przeżyje w pożywce dłużej niż 2 tygodnie bez roślin (23). Z uwagi na możliwość zasiedlania różnych tkanek, powinno się pobierać do indeksowania podstawę pędu, wiązki przewodzące i liście lub fragmenty kalusa. Niekiedy wzrost bakterii udaje się zauważyć dopiero w kolejnych, kilkakrotnie ponawianych testach, prowadzonych na różnych pożywkach, przy różnych rozcieńczeniach składników pożywek (28) i podwyższeniu wartości pH (64). W celu izolacji bakterii z tkanek można zastosować wytrząsanie eksplantatu w pożywce płynnej przez kilka, kilkanaście godzin, wirowanie albo umieszczanie tkanek w warunkach podciśnienia lub homogenizację fragmentów, a następnie posiew na stałe pożywki bakteryjne; ważna jest także temperatura i długość okresu inkubacji. Thomas (63) proponuje wykrywanie 3-etapowe: obserwacja świeżo wyszczepionego eksplantatu, indeksowanie pożywki spod eksplantatów i indeksowanie fragmentów tkanek na pożywkach bakteryjnych. Do indeksowania należy użyć co najmniej kilku różnych pożywek bakteryjnych, a proces kontroli prowadzić w różnych temperaturach i przez różny okres (65). Fitoplazmy nie mogą być utrzymywane i hodowane na podłożach, ponieważ, z wyjątkiem rodzaju *Spirullea* (19), na razie nie poznano ich specyficznych wymagań pokarmowych. Obecność fitoplazm w kulturze roślinnej zdradza nadmierna skłonność do proliferacji pędów i uniezależnienie się od cytokininy egzogennej (51). Liczebność i skład bakterii zasiedlających kultury jest uzależniony od środowiska, w którym rosły rośliny donorowe. Kultury założone z roślin rosnących w podłożu organicznym były bardziej zakażone bakteriami od tych, które rosły na glebach piaszczystych (66).

W przypadku wyniku negatywnego (brak wzrostu) na specyficznych pożywkach bakteryjnych, należy, szczególnie w odniesieniu do bakterii patogenicznych, stosować metody wykrywania oparte na reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla gatunków lub ogólnymi, dla bakterii (25,67,68). Te metody są obecnie najczęściej używane z uwagi na czułość, znacznie wyższą od metod serologicznych (75). Wykrywanie bakterii w tkankach (indeksowanie) powinno być stałym elementem procesu mikrorozmnażania. Zawsze powinna być utrzymywana pula tkanek testowanych okresowo, zdefiniowanych jako wolne od bakterii, która jest wprowadzana do produkcji i/lub doświadczeń na miejsce kultur wykazujących obecność bakterii.

3.2. Identyfikacja bakterii

Identyfikacja do gatunku jest potrzebna w celu określenia potencjalnego źródła zakażenia oraz celowanego użycia środków bakteriobójczych (69). Proces identyfikacji polega na zdobywaniu kolejnych informacji o izolacie i porównywaniu z cechami zgromadzonymi w kluczach do oznaczania (70-72). Podstawowym badaniem jest poznanie struktury ściany komórkowej, która może być zbudowana z wielu (Gram +) lub zaledwie kilku warstw (Gram -) polimeru mureiny. Następne etapy, to określenie zdolności do tworzenia endospor – organów przetrwalnikowych, zabarwienia na pożywce zawierającej ekstrakt drożdżowy i dekstrozę, tworzenia barwnika fluorescencyjnego na pożywce KING B, aktywności ureazy, upłynniania żelatyny, wykorzystania argininy i betainy, wzrostu w różnych temperaturach i in. Opracowano pożywki selekcyjne i wybiórcze, zawierające zróżnicowane źródła węgla i substancji odżywczych. Określenie przynależności rodzajowej bakterii następuje na podstawie obserwacji zdolności do wykorzystania charakterystycznych składników pożywek. Za pomocą specyficznych pożywek, można np., wykryć *Methylobacterium* (73), fluorozujące formy *Pseudomonas* (74) i inne. Szeroki wybór pożywek wybiórczych dla bakterii patogenicznych dla roślin zamieszczają Schaad i wsp. (72).

Komercyjne testy biochemiczne, takie jak API i Biolog oparte na wymaganiach pokarmowych bakterii lub inne, oparte na analizie profili kwasów tłuszczowych, zostały opracowane przede wszystkim dla potrzeb medycyny i przemysłu spożywczego, a także dla patogenów roślin; do identyfikacji bakterii w kulturach mają mniejsze zastosowanie (75). Do wykrywania i identyfikacji bakterii stosuje się również techniki oparte na reakcji serologicznej – test ELISA (75) i enzymatycznej – testy immunofluorescencyjne IF, IFAS (76).

W ostatnich piętnastu latach do wykrywania i identyfikacji bakterii coraz szerzej stosowane są metody oparte na analizie DNA (75,77-79). Ze wszystkich znanych, jest to metoda najbardziej uniwersalna, ponieważ wykrywany jest bardzo stabilny związek chemiczny obecny w każdej komórce. Najczęściej stosowane i najprostsze są techniki oparte na reakcji PCR. Identyfikacji można dokonać na poziomie grupy systematycznej *Bacteria* (80), rodzaju (25,81,82), gatunku (83,84) i patowaru (85),

przy użyciu specyficznych starterów, powielających pojedyncze fragmenty DNA lub za pomocą starterów uniwersalnych dla bakterii i fitoplazm, pozwalających na amplifikację fragmentów, które po trawieniu enzymami restrykcyjnym tworzą na obrazie rozdziału elektroforetycznego profile, charakterystyczne dla rodzaju lub gatunku (67,86,87). Budowa wymienionych starterów jest oparta na sekwencji 16S rDNA. Są także metody identyfikacji oparte na starterach opracowanych na bazie sekwencji genów funkcjonalnych, np. *fusA* – *fus* AF i *fusAR* lub *gyrB* – *gyrBBAUP2* i *gyrBBNDN1* (88,89). Przy braku odpowiednich starterów specyficznych dla gatunku można posłużyć się analizą pełnej sekwencji fragmentu (najczęściej 16S rDNA), otrzymanego za pomocą amplifikacji ze starterami dla rodzajów lub ogólnymi dla bakterii, przez porównanie z sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych (15,90,91). Zaprojektowano także startery dla specyficznego wykrywania grup bakterii gramodatnich i gramujemnych (92). Techniki identyfikacji na bazie markerów DNA mają także zastosowanie w detekcji, kiedy brak jest wizualnych oznak obecności bakterii na eksplantatach lub pożywce roślinnej. Stosuje się wówczas najpierw izolowanie bakterii na selekcyjną pożywkę bakteryjną, a DNA otrzymuje się z kultury bakteryjnej. Ekstrakcja DNA bezpośrednio z materiału roślinnego lub pożywki nie zawsze pozwala na wykrywanie metodą PCR z powodu zbyt małej ilości badanego DNA lub obecności inhibitorów reakcji PCR. Izolacja DNA z pożywki selekcyjnej (ang. *enrichment*) ma także tę zaletę, że wykrywa DNA z żywych komórek, co ma szczególne znaczenie przy wykonywaniu testów po sterylizacji materiału. W użyciu są już testy, które pozwalają na ilościowe wykrywanie DNA bakterii (tzw. PCR w czasie rzeczywistym – ang. *Real Time-PCR*), a także wykrywanie wielu organizmów równocześnie za pomocą techniki Multiplex PCR lub bardziej złożonej i znacznie droższej techniki mikromacierzy (ang. *chip DNA* lub *microarrays*), jednak są one dostępne głównie w celu detekcji bakterii chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt lub ważnych dla procesów technologicznych i środowiska (79). Innym sposobem wykrywania bakterii jest badanie przewodności elektrycznej pożywki selekcyjnej. Dla tej metody dostępny jest zautomatyzowany system o nazwie RABIT, używany do oceny mikrobiologicznej żywności gotowej do spożycia (93).

4. Zwalczanie i ograniczanie populacji bakterii w kulturach roślinnych

O czystości mikrobiologicznej kultur *in vitro* decydują: uprawa roślin donorych w szczególnie ostrym reżimie fitosanitarnym, staranne odkażanie eksplantatów inicjalnych, zachowanie wysokich standardów fitosanitarnych w czasie prowadzenia kultur oraz częste testowanie na obecność mikroorganizmów. Podstawowe substancje odkażające powierzchnie eksplantatów, to związki nieorganiczne wyzwalające aktywny chlor (podchloryny wapnia i sodu) oraz sublimat rtęciowy. Ten ostatni jest coraz rzadziej używany ze względu na szkodliwość dla personelu i środowiska. Ponadto, stwierdzono, że ten związek nie działa bakteriobójczo, a tylko

bakteriostatycznie (94). Lepsze efekty uzyskiwano przy odkażaniu organicznym związkami chloru – dichloroisocyanuratem sodowym (NaDCC), który był mniej toksyczny wobec *Spathiphyllum*, a bardziej skuteczny w eliminacji bakterii z rodzaju *Xanthomonas*, *Pseudomonas* i *Actinomycetes* (95) oraz PPM, ang. *Plant Preservation Mixture*[™], zawierającym komponenty izotiazolowe. Preparat ten jest stabilny w wysokich temperaturach i w niewielkim stopniu fitotoksyczny (96,97). Stężenia oraz czas działania środków sterylizujących należy ustalić eksperymentalnie dla typu eksplantatu, warunków wzrostu rośliny donorowej, pory roku, itp. Bakterie endogenne można eliminować stosując odkażanie wewnętrzne, najlepiej eksplantatów inicjalnych, za pomocą systemicznych środków odkażających, np. cytrynianu (62, 98,99) i innych związków 8-hydroksychinolini (29). Stosowanie antybiotyków na tym etapie jest niezasadne, chyba, że wcześniej zostanie poznana przynależność systematyczna bakterii zasiedlających eksplantaty inicjalne i ich wrażliwość na antybiotyki (36). W uporczywych zakażeniach bakteryjnych odkażanie należy powtórzyć, stosując różne techniki i preparaty w celu stopniowego wyniszczenia populacji lub zniszczenia wszystkich kiełkujących zarodników, za pomocą, np. traktowania pulsowego środkami odkażającymi (100), w podciśnieniu, z użyciem sonikacji i innych (98,102). Odkażanie można powtarzać w odstępach dobowych lub kilkudniowych.

Bakterie endogenne, które w stanie latentnym lub utajonym pozostały w eksplantatach, będą, z dużym prawdopodobieństwem, namnażać się i ujawnią po kilku, kilkunastu pasażach w fazie intensywnego namnażania lub ukorzeniania. Jest to bardzo trudny problem i zdecydowanie jednoznaczny tylko w odniesieniu do patogenów, ponieważ kultury nimi zakażone trzeba usuwać. W przypadku, gdy kultury są zakażone innymi bakteriami należy przystosować warunki kultury do ograniczania populacji bakterii, za pomocą czynników chemicznych, takich jak antybiotyki, azotan srebra, PPM, Vitrofurale, olejki eteryczne i inne bakteriocydy i bakteriostatyki. Preparaty te można dodawać do pożywki lub stosować kąpiele odkażające dla części eksplantatów przeznaczonych do dalszego mnożenia. Pomocne może być obniżenie kwasowości pożywki lub obniżenie temperatury.

Umiejętne stosowanie antybiotyków ma podstawowe znaczenie. Stwierdzono wielokrotnie ich skuteczność w odkażaniu (102). Stosowanie antybiotyków musi być poprzedzone ustaleniem odporności szczepów, minimalnego stężenia bakterioobójczego i czasu działania (29,69). Przy porażeniach mieszanych, a na ogół z takimi mamy do czynienia w kulturach rozmnażanych przez dłuższy czas, należy stosować antybiotyki w precyzyjnie skomponowanych mieszankach (17,59,64), ponieważ pojedynczy antybiotyk zazwyczaj nie wyeliminuje wszystkich bakterii. Część antybiotyków ma działanie tylko bakteriostatyczne. W takim przypadku, po usunięciu czynnika ograniczającego bakterie mogą się znów namnażać (69). Jednocześnie, długotrwałe stosowanie antybiotyków powoduje selekcję szczepów odpornych na antybiotyki (69). Preparaty inne niż antybiotyki działają wielotorowo, a zatem proces przystosowawczy bakterii może być bardziej skomplikowany. Inną stroną stosowa-

nia niektórych antybiotyków jest ich fitotoksyczność (15,60,64) oraz wpływ na morfogenezę (102-105).

Zawsze zalecanym postępowaniem jest częste inicjowanie kultur i wymiana kultur starych na nowe w cyklach rocznych lub dwuletnich.

5. Uwagi końcowe

Kulturom roślinnym *in vitro* towarzyszą bardzo często bakterie należące do różnych grup, rodzajów i różnego pochodzenia. Są one wnoszone z inicjalnym materiałem roślinnym albo wprowadzane do kultur ze środowiska laboratoryjnego w trakcie pracy. Zagrożają one nie tylko kulturom, ale także pracownikom, ponieważ mogą być źródłem rozprzestrzeniania patogenów ludzkich i bakterii psujących żywność, np. *Trichophyton*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* (28), *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* (106), *Bacillus cereus* (65). Zakażenia wnoszone z materiałem roślinnym są spowodowane niewłaściwą procedurą sterylizacji lub zasiedleniem tkanek roślinnych bakteriami endogennymi, co można zminimalizować poprzez prekulturę roślin donorowych w zastrzonych warunkach sanitarnych oraz pobieranie możliwie małych eksplantatów, a także przez bardzo skrupulatne testowanie obecności bakterii w tkankach. Zakażenia mogą rozprzestrzeniać się pomiędzy naczyniami za pośrednictwem roztoczy lub wciornastków, mogą być wynikiem niedostatecznej dbałości o stan sanitarny pomieszczeń laboratoryjnych i nieprzestrzegania procedur przy pracy lub też mogą być spowodowane przez dysfunkcję kamer do prac sterylnych.

Zakażenia bakteryjne w kulturach tkanek roślinnych są niekorzystne nawet, wówczas gdy nie są to bakterie patogeniczne, a także, jeśli sprzyjają one niektórym procesom rozwojowym. Bakterie zasiedlające bezobjawowo kultury *in vitro* mogą ujawnić swe właściwości patogeniczne po przeniesieniu do warunków szklarni lub pola, poziom wirulencji bakterii może wzrosnąć w wyniku zmian mutacyjnych, obniżonej odporności tkanek roślinnych lub zmiany warunków fizykochemicznych (107). Upowszechnia się ostatnio odejście od określania kultur roślinnych jako sterylne (ang. *axenic*), bo wiadomo obecnie, jak trudno spełnić ten postulat (108,109). Niektórzy badacze podają w wątpliwość możliwość całkowitej eliminacji bakterii z kultur *in vitro* (8,110,111), dlatego należy być przygotowanym na to, aby tak, jak w przypadku produkcji materiału rozmnożeniowego w warunkach *in vivo*, utrzymywać populacje bakterii neutralnych w równowadze, na poziomie niewywołującym witropatii, poprzez włączanie do pożywki preparatów i związków bakteriobójczych lub bakteriostatycznych nieszkodliwych dla tkanek roślinnych oraz często zakładać nowe kultury, a bezwzględnie eliminować kultury zasiedlone bakteriami patogenicznymi.

Literatura

1. Knauss J. F., Knauss M. E., (1979), Proc. Fla. State Hort. Soc., 92, 341-343.
2. Debergh P., Maene L., (1984), Parasitica, 40, 69-75.
3. Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A., (2000), Appl. Environm. Microbiol., 66, 3073-3077.
4. Gilbert P., Allison D. G., McBain A. J., (2002), J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl., 92, 98S-110S.
5. Lindow S. E., Brandl M. T., (2003), Appl. Environm. Microbiol., 69, 1875-1883.
6. Holland M. A., Polacco J. C., (1994), Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45, 197-209.
7. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W., (1997), Can J. Microbiol., 43, 895-914.
8. Herman E. B., (1990), Acta Horticult., 280, 233-238.
9. Benezet H. J., Knowles C. O., (1982), Archives Environmental Contamination and Toxicology, 11, 107-110.
10. Sledgehammer A., Tackhammer A., (1990), Plant Physiol., 92, 281-285.
11. Reed B. M., (1992), Fruit Variety Journal, 46, 98-102.
12. Pence V. C., Sandoval J. A., (2002), in: *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*, Eds. Pence V. C., Sandoval J. A., Vilalobos V. M., Engelman F., IPGRI technical bulletin No. 7. Rome, International Plant Genetic Resources Institute, 30-40.
13. Thomas P., (2004), Plant Cell Tissue Organ Culture, 77, 173-179.
14. Thomas P., Prakash G. S., (2004), In Vitro Cell Dev. Biol.–Plant, 40, 603-607.
15. Wojtania A., Puławska J., Gabryszewska E., (2005), J. Fruit and Ornamental Plant Research, 13, 101-108.
16. Leifert C., Waites W. M., Nicholas J. R., (1989), J. Appl. Bacteriol., 67, 353-361.
17. Leifert C., Camotta H., Wright S. M., Waites B., Cheyne V. A., Waites W. M., (1991), J. Appl. Bacteriol., 71, 307-330.
18. Reby E., (2001), *Zakażenia powodowane przez bakterie i grzyby w kulturach in vitro i możliwości ich ograniczania*, praca doktorska, Akademia Rolnicza, Kraków.
19. Bové J. M., Garnier M., (1998), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, 7-16.
20. Reuther G., (1988), Acta Hort., 225, 139-152.
21. Cassels A. C., Carney B. F., Harmey M. A., (1988), Acta Horticulturariae, 225, 153-161.
22. Knauss J. F., (1976), Proc. Fla. State Hort. Soc., 89, 293-296.
23. Norman D. J., Alvarez A. M., (1994), Plant Cell, Tissue Organ Culture, 39, 55-61.
24. Cassels A. C., (1997), in: *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-13.
25. Toth I. K., Hyman L. J., Wood J. R., (1999), J. Appl. Microbiol., 87, 158-166.
26. Leifert C., Cassels A. C., (2001), In Vitro Cell Dev. Biol.–Plants, 37, 133-138.
27. van der Linde P.C.G., (2000), Acta Horticult., 530, 93-101.
28. Leifert C., Woodward S., (1998), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52, 83-88.
29. Zenktele E., (2001), w: *Biotechnologia roślin*, red. Malepszy S., PWN, Warszawa, 273-291.
30. Cassels A. C., O'Herlihy E. A., (2003), Acta Horticulturariae, 616, 105-114.
31. Hennerty M. J., Upton M. E., Harris D. P., Eaton R. A., (1988), Acta Horticult., 225, 129-137.
32. Leifert C., Waites W. M., Camotta H., Nicholas J. R., (1989a), J. Appl. Bacteriol., 67, 363-370.
33. Liu, Tsu-hwie A., Hsu, Nai-wen, Wu, Rey-yuh, (2005), In Vitro Cel. Dev. Biol.–Plant, 41, 546-549.
34. Debergh P. C., Vanderschaeghe A. M., (1988), Acta Horticulturariae, 225, 77-81.
35. Leifert C., Ritchie J. Y., Waites W. M., (1991b), J. Microbiol. Biotechnol., 7, 452-469.
36. Tanprasert P., Reed B. M., (1998), Plant Cell, Tissue Organ Culture, 52, 53-55.
37. Thomas P., (2004b), J. Appl. Microbiol., 97, 114-123.
38. Patten C. L., Glick B. R., (2002), Appl. Environm. Microbiol., 68, 3795-3801.
39. Mihajlević S., Katavić V., Jelaska S., (1999), Plant Sci., 141, 73-80.
40. Villalobos-Amador E., Rodríguez-Hernández G., Pérez-Molphe-balch E., (2002), Plant Cell Reports, 20, 779-785.

41. Devi P., Rani S., (2002), *Sci. Hort.*, 93, 179-186.
42. Burns J. A., Schwarz O. J., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 405-408.
43. Werbrouck S., Goethals K., van Montagu M., Debergh P., (1999), in: *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, Eds. Altman et al., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 667-672.
44. Sunayana M. R., Sasikala Ch., Ramana Ch. V., (2005), *Biotechnol. Letters*, 27, 1897-1900.
45. Murthy N. S., Vettakkorumakankav N. N., Raj K., Odumeru J., Saxena P. K., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 607-613.
46. Ueno K.-i., Cheplick S., Shetty K., (1998), *Process Biochemistry*, 33, 441-445.
47. Frommel M. I., Nowak J., Lazarovits G., (1991), *Plant Physiol.*, 96, 928-936.
48. Smigocki A. C., Hammerschlag F. A., (1991), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 116, 808-811.
49. Hornschuh M., Grotha R., Kutschera U., (2002), *Development Plant Biol.*, 4, 682-687.
50. Kalyaeva M. A., Ivanova E. G., Doronina N. V., Zakcharchenko N. S., Trotsenko Yu. A., Buryanov Ya. A., (2003), *Russ. J. Plant Physiol.*, 50, 313-317.
51. Lidstrom M. E., Chistoserdova L., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 1818.
52. Gabryszewska E., Kaminska M., Korbin M., Rudzinska-Langwald A., (2000), *Acta Soc. Bot. Poloniae*, 69, 109-113.
53. Sato M., Watanabe K., Yazawa M., Takikawa Y., Nishiyama K., (1997), *Phytopathology*, 87, 1192-1196.
54. Mercier J., Lindow S. E., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 369-374.
55. Beattie G. A., Lindow S. E., (1999), *Phytopathology*, 89, 53-359.
56. Epton H. A. S., (1997), in: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 299-308.
57. Tahmatsidou V. I., Caseels A. C., (1997), in: *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 175-181.
58. Widholm J. M., (1996), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 45, 201-205.
59. Reed B. M., Mentzer J., Tanprasert P., Yu X., (1998), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 52, 67-70.
60. Seyring M., (1998), *Gartenbauwissenschaft*, 63, 27-33.
61. Birmeta G., Passoth V., Roos S., Welander M., (2004), *Biotechnology Letters*, 26, 1867-1872.
62. Zenktele E., (1998), *Biotechnologia*, 1(40), 149-166.
63. Thomas P., (2004), *Current Sci.*, 87, 67-72.
64. Leifert C., Waites W. M., (1992), *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 460-466.
65. Zenktele E., Włodarczak K., Kłossowska M., (1997), in: *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 183-191.
66. Cassels A. C., Tahmatsidou V., (1996), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 15-26.
67. Isenegger D. A., Taylor P. W., Mullins K., McGregor G. R., Barlass M., Hutchinson J. F., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 814-820.
68. Khoodoo M. H. R., Sahin F., Jaufeerally-Fakim Y., (2005), *Eur. J. Plant Pathol.*, 112, 379-390.
69. Falkiner F. R., (1997), in: *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155-160.
70. Fahy P. C., Hayward A. C., (1983), in: *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*, Eds. Fahy P. C., Persley G. J., Academic Press, Australia, 337-377.
71. Bradbury J. F., (1988), *Acta Horticulturae*, 225, 27-37.
72. Schaad N. W., Jones J. B., Chum W., (2001), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed., APS Press, St. Paul, Minnesota.
73. Corpe W. A., (1985), *J. Microbiol. Methods*, 3, 215-221.
74. King E. O., Ward M. K., Raney D. E., (1954), *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
75. Stead D. E., Elphinstone I.G., Weller S., Smith N., Hennessy J., (2000), *Acta Horticult.*, 530, 45-55.
76. Wullings B. A., van Beuningen A. R., Janse J. D., Akkermans A. D. L., (1998), *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 4546-4554.
77. Stead D. E., Hennessy J., Wilson J., (1998), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 52, 17-25.
78. Louws F. J., Rademaker J. L. W., de Bruijn F. J., (1999), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37, 81-125.
79. Alvarez A. M., (2004), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 339-366.

80. 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.
81. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S., (1995), *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 2879-2884.
82. Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P. M., Watrud L. S., Giovanni G. D., (1998), *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 2545-2553.
83. Cubero J., Martinez M. C., Llop P., Lopez M. M., (1999), *J. Appl. Microbiol.*, 86, 591-606.
84. Taylor R. K., Guilford P. J., Clark R. G., Hale C. N., Foster R. L. S., (2001), *New Zealand J. Crop and Hort. Sci.*, 29, 35-43.
85. Sulzinski M.A., (2001), *J. Phytopathol.*, 149, 45-49.
86. Lee I.-M., Hammond R. W., Davis R. E., Gundersen D. E., (1993), *Molec. Plant Pathol.*, 83, 834-842.
87. Guo Y., Cheng Z., Walla J. A., (2003), *HortScience*, 38, 1134-1136.
88. Santos S. R., Ochman H., (2004), *Environm. Microbiol.*, 6, 754-759.
89. de Clerck E., Vanhoutte T., Hebb T., Geerinck J., Devos J., de Vos P., (2004), *Appl. Environm. Microbiol.*, 70, 3664-3672.
90. Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6955-6959.
91. Sacchi C. T., Whitney A. M., Mayer L. W., Morey R., Steigerwalt A., Boras A., Weyant R., Popovic T., (2002), *Emerging Infectious Diseases*, 8, 1117-1122.
92. Klausegger A., Hell M., Berger A., Zinober K., Baier S., Jones N., Sperl., Kofler B., (1999), *J. Clin. Microbiol.*, 37, 464-466.
93. Ribeiro T., Romestant G., Depoortere J., Pauss A., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 35-41.
94. Różański S., (2005), *Środki antyseptyczne i odkażające stosowane w medycynie*, <http://luskiewnik.web-park.pl/antisepticum2002.htm>.
95. Parkinson M., Prendergast M., Sayegh A. J., (1996), *Plant Growth Regulation*, 20, 61-66.
96. Niedz R. P., Balsher M. G., (2002), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, 468-471.
97. Fuller M. P., Pizzey T., (2001), *Acta Hort.*, 560, 567-570.
98. Zenkteler E., (2001), *Biotechnologia*, 4 (55), 67-99.
99. Read P. E., Qiguang Y., (1985), *Acta Horticult.*, 212, 55-58.
100. Szendrak E., Read P. E., Yang G., (1997), in: *Pathogen and microbial contamination maenaement in micropropagation*, Ed. Cassels A. C., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 233-236.
101. Teng W.-L., Nicholson L., (1997), *Plant Cell Reports*, 16, 531-535.
102. Herman E. B., (2004), *Microbial "contaminants" in plant tissue cultures: solutions and opportunities 1996-2003*, Agritech Consultants, Inc. Shrub Oak.
103. Holford P., Newbury H. J., (1992), *Plant Cell Reports*, 11, 93-96.
104. Nakano M., Mii M., (1993), *J. Plant Physiol.*, 141, 721-725.
105. Lin J.-J., Assad-Garcia N., Kuo J., (1995), *Plant Sci.*, 109, 171-177.
106. Rafferty S. M., Williams S., Falkiner F. R., Cassels A. C., (2000), *Acta Horticult.*, 530, 145-152.
107. Falkiner F. R., (2000), *Acta Hort.*, 530, 83-86.
108. Cassels A. C., (1991), in: *Micropropagation*, Eds. Debergh P. C., Zimmerman R. H., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 31-44.
109. Ewald D., Zaspel I., Naujoks G., Behrendt U., (2000), *Acta Hort.*, 530, 137-144.
110. Holland M. A., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 865-968.
111. Leifert C., (2000), *Acta Hort.*, 530, 87-91.