

**MIKROROZMNAŻANIE MALINY (*RUBUS IDAEUS* L.)
PRZY ZASTOSOWANIU BIOCYDÓW
OGRANICZAJĄCYCH ZANIECZYSZCZENIA BAKTERYJNE**

**MICROPROPAGATION OF RASPBERRY (*RUBUS IDAEUS* L.)
USING BIOCIDES THAT REDUCE BACTERIAL CONTAMINATION**

**Teresa Orlikowska, Lucyna Ogórek, Aleksandra Trzewik,
Katarzyna Nowak, Robert Maciorowski**

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
e-mail: Teresa.Orlikowska@inhort.pl

Abstract

Plant tissues are inhabited by a number of bacteria that are not eliminated by surface decontamination used routinely, before the explants are introduced to *in vitro* conditions. During several months of multiplication comes to the disclosure of these bacteria, which in some circumstances begin to multiply. At this stage bacteria are often associated with a decrease in the condition of cultures, as well as with difficulty during acclimatization of microplants. Four bacterial strains were isolated from the explants of raspberry cultivar 'Polka', and one bacterial strain from 'Polana'. As a result of removal of apparently contaminated cultures, only one strain remained in 'Polka' (*Curtobacterium* sp.), and one in 'Polana' (*Luteibacter* sp.). The purpose of experiments was to select biocides that limit the multiplication of bacteria but they are not harmful to explants. For this purpose, multiplication and rooting of shoots was carried out on media containing various concentrations of PPMTM, NaOCl and several antibiotics, which in the diffusion tests completely inhibited or significantly limited the growth of these bacteria. It was shown that rifampicin (50 mg·dm⁻³), erythromycin (50 mg·dm⁻³), cefotaxime (250 mg·dm⁻³) and PPMTM (0.2%) reduced bacteria multiplication (with minor effect of PPM), i.e. bacteria did not leak and did not appear in the medium if biocide was included. Bacteria, however, remained alive, because they grew out from the lower fragments of shoots lined on bacterial medium. These biocides in the concentrations used did not have a negative effect on raspberry cultures, and rifampicin, erythromycin and cefotaxime even slightly increased the plants multiplication coefficient and the condition of plant cultures. It can therefore be concluded that the above biocides can be safely used in reducing bacterial contamination in raspberry *in vitro* cultures.

Key words: antibiotics, bacterial contamination, biocides, micropropagation, raspberry

WSTĘP

Owoce maliny są doceniane przez konsumentów ze względu na piękny wygląd, dobry smak i wysoką wartość dietetyczną. Owoce maliny

są spożywane świeże, a także zamrażane, przerabiane na pulpy i soki, które stanowią dodatek do żywności, także dla małych dzieci. Malina jest uznanym źródłem wartościowych związków prozdrowotnych (Baranowska i in. 2015). Polska jest jednym z głównych producentów owoców maliny w Europie i na świecie dostarczając ok. 20% światowej produkcji malin (FAOSTAT, GUS 2016). Powierzchnia uprawy maliny ma w Polsce tendencję wzrostową (29 282 ha w 2016 roku, o ok. 3 tys. ha więcej niż w roku 2015). Wiąże się to z większym zapotrzebowaniem na sadzonki, których na 1 ha sadzi się ok. 13 000. Sadzonki są pozyskiwane z plantacji produkcyjnych i ze szkółek polowych. Ze względu na choroby powodowane przez wirusy, z których niektóre całkowicie niszczą owoce (Daubeny i in. 1978), jest wskazane, aby plantacje matecznikowe (a także produkcyjne) zakładać z materiału odwirusowanego i mnożonego w warunkach *in vitro*.

Pierwsze próby zastosowania kultur *in vitro* do otrzymania zdrowych roślin maliny prowadzono już w latach 60 ubiegłego wieku (Shchelkunova i Popov 1970). Procedura mikrorozmnażania maliny jest znana od lat 80 ubiegłego wieku (Anderson 1980; Snir 1981). W Polsce badania nad rozmnażaniem maliny *in vitro* prowadziła jako pierwsza dr Danuta Sobczykiewicz (1984; 1992). W następnych latach optymalizowano proces mikrorozmnażania i regeneracji pędów przybyszowych (Zawadzka i Orlikowska 2006).

W ramach zadań Programu Wieloletniego pracowano nad sposobem wytwarzania materiału nasadzeniowego maliny wysokiej jakości w oparciu o metodę *in vitro*. Największym problemem w mikrorozmnażaniu większości odmian maliny jest występowanie zanieczyszczeń bakteryjnych, wprowadzonych z eksplantatami inicjalnymi. Odkazanie materiału inicjalnego dotyczy zazwyczaj tylko powierzchni. Wiele bakterii o charakterze endofitycznym bytuje w tkankach roślin, w tym część w stanie utajonym (Orlikowska i Zawadzka 2006; Orlikowska i in. 2010). Wiele z nich ujawnia się na pożywce inicjalnej, szczególnie takiej, która zawiera azot organiczny, ale część dopiero później, po kilku lub kilkunastu pasażach (Leifert i in. 1991). Ujawnieniom bakterii sprzyjają warunki stresujące, które prowadzą do nekrotyzacji tkanek. Takie okoliczności mogą być spowodowane m.in. zmianą regulatorów wzrostu lub podwyższoną temperaturą w pomieszczeniu wzrostowym. Niektóre bakterie zaczynają się rozmnażać w czasie długotrwałego przechowywania kultur w niskiej temperaturze (Thomas i in. 2008). Są one szczególnie zagrożeniem dla kultur długotrwanie przechowywanych w bankach genów (Reed i in. 1995; Sarasan i in. 2006). Na ogół w tkankach eksplantatów w kulturach bytują bakterie, które nie są patogenami, jednak mogą powodować tzw. wiotropatie, które najczęściej prowadzą do obniżenia współczynnika namnażania, ukorzeniania i aklimatyzacji pędów (Thomas 2004a, b; Quambusch i in. 2014). Całkowite usunięcie bakterii z tkanek roślinnych jest niemożliwe z powodów technicznych (Herman 1990). Bakterie kolonizują nie tylko

wiązki przewodzące i przestrzenie międzykomórkowe, ale także wnętrza komórek (Pirttilä i in. 2000), a substancje odkażające są często toksyczne nie tylko dla bakterii, ale także dla komórek roślinnych. W warunkach naturalnych bakterie endogenne stanowią z rośliną jeden organizm, udostępniają ważne produkty własnego metabolizmu i kierują metabolizmem rośliny, kontrolują poziom stresu, indukują odporność, ułatwiają pobieranie składników pokarmowych ze środowiska (Rosenblueth i Martinez-Romero 2006; Friesen i in. 2011). Stwierdzono także pozytywny wpływ niektórych bakterii na efektywność rozmnażania roślin w kulturach *in vitro* (Zawadzka i in. 2013; Orlikowska i in. 2017).

W opracowaniu przedstawiono wyniki doświadczeń prowadzonych nad wpływem różnych substancji bakteriobójczych i bakteriostatycznych włączanych do pożywki na ograniczenie mnożenia się bakterii zanieczyszczających kultury maliny, ale nieszkodliwych dla tkanek rośliny.

MATERIAŁY I METODY

Doświadczenia wykonywano w latach 2016–2017 na dwóch odmianach maliny – ‘Polka’ i ‘Polana’. Kultury zostały zainicjowane z wolnych od wirusów jednorocznych sadzonek rosnących w pojemnikach wstawionych do szklarni w lutym 2016, po przejściu spoczynku zimowego. Wierzchołki pędów były pobierane sukcesywnie w miarę rozwoju i przenoszone w pojemniku z wodą do laboratorium, gdzie usuwano rozwinięte liście, a pędy płukano pod bieżącą wodą przez 1–2 godziny. Pędy zanurzano w wodzie z detergentem, potem w 70% alkoholu etylowym, a następnie odkażano przez 1,5 minuty w 0,1% wodnym roztworze chlorku rtęci. Następnie pędy 3-krotnie płukano po 5 minut w sterylnej wodzie. Pędy po skróceniu do 5 mm i odjęciu rozwiniętych w czasie odkażania liści umieszczano indywidualnie w probówkach, na pożywce zawierającej ½ kompletu soli mineralnych Murashige i Skooga – MS (1962), z dodatkiem witamin wg Lloyd i McCown (1980), 0,5 mg·dm⁻³ benzyloaminopuryny (BAP), 30 g·dm⁻³ sacharozy, 250 mg·dm⁻³ albuminy mlecznej. Pożywkę zestalano 6 g·dm⁻³ agaru Plant (Duchefa). Kwasowość ustalano przed autoklawowaniem na 5,7. Kultury sukcesywnie przeglądano i usuwano zanieczyszczone bakteriami oraz grzybami. Po miesiącu zielone pędy bez oznak zanieczyszczenia mikrobiologicznego przenoszono indywidualnie do kolb Erlenmeyera o pojemności 50 ml, zawierających pożywkę o pH 5,7 i składzie: sole mineralne MS + dodatkowo 85,45 mg·dm⁻³ MgSO₄, witaminy wg Lloyd i McCown (1980), 0,6 mg·dm⁻³ BAP, 0,1 mg·dm⁻³ IBA, 30 g·dm⁻³ sacharozy, 6 g·dm⁻³ agaru Plant. Wszystkie odczynniki były zakupione w firmie Duchefa (Holandia). Proliferujące eksplantaty dzielono na pojedyncze pędy i przenoszono co 6 tygodni na świeżą pożywkę, zastępując FeEDTA równoważną ilością FeEDDHA (50 mg·dm⁻³), według modyfikacji opracowanej przez Zawadzką i Orlikowską (2006). Po

6–8 pasażach pędy o długości ok. 1,5 cm ukorzeniano na pożywce MS z witaminami (Lloyd i McCown 1980), z dodatkiem $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IBA, a także $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ryboflawiny, $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy i $5,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ agaru Plant. Przez pierwsze 5 dni kultury przebywały w ciemności, a następnie na świetle. Warunki w fitotronie były następujące: fotoperiod 16/8 przy oświetleniu lampami fluorescencyjnymi emitującymi białe światło (LF 36V, Pila), temperatura $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Intensywność oświetlenia w czasie inicjacji wynosiła $20\text{--}30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a w czasie namnażania i ukorzeniania $50\text{--}60 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Po 4 tygodniach ukorzenione pędy wyjmowano z pożywki, opłukiwano z agaru i sadzono w szklarni do skrzynek wypełnionych mieszaniną torfu (Klassman TS1) i perlitu (2 : 1). Co 7 dni aplikowano preparat Rovral Aquaflo 500 SC w stężeniu 0,2%, w formie opryskiwania dla zapobiegania szarej pleśni. Dla stymulacji wzrostu stosowano preparat Huwa-San TR 50 w stężeniu 0,05%. Co 10 dni rośliny nawożono roztworem nawozu wieloskładnikowego Kristalon (18 : 18 : 18 : 3 + Micro). Skrzynki z roślinami umieszczano w szklarni, w foliowych tunelikach zapewniających 100% wilgotności powietrza przez pierwsze 10 dni. Po tym okresie rozpoczynano obniżanie wilgotności przez stopniowe uchylanie folii, a po około 3 tygodniach tuneliki usuwano.

Przez pierwsze 3 pasáže w czasie przenoszenia pędów na pożywkę proliferacyjną i do ukorzeniania dolne części pędów odcinano i przenoszono na pożywki bakteryjne Nutrient Agar (NA) i 523 (Viss i in. 1991) w celu wyizolowania bakterii zasiedlających wewnętrzne tkanki. Wyrastające bakterie oczyszczono i poddano testom antybiogramowym w celu określenia ich wrażliwości na biocydy. Antybiogramy wykonano na pożywce Mueller-Hinton z wykorzystaniem następujących krążków antybiotykowych firmy Oxoid: ampicylina – $25 \mu\text{g}$ (AMP 25); cefotaksym – $30 \mu\text{g}$ (CTX 30); chloramfenikol – $30 \mu\text{g}$ (C 30); doksycyklina – $30 \mu\text{g}$ (DO 30); erytromycyna – $30 \mu\text{g}$ (E 30); gentamycyna – $30 \mu\text{g}$ (CN 30); kanamycyna – $30 \mu\text{g}$ (K 30); karbenicylina – $100 \mu\text{g}$ (CAR 100); neomycyna – $30 \mu\text{g}$ (N 30); ryfampicyna – $30 \mu\text{g}$ (RD 30); streptomycyna – $10 \mu\text{g}$ (S 10); tetracyklina – $30 \mu\text{g}$ (TE 30); vankomycyna – $30 \mu\text{g}$ (VA 30). Do testów z PPM (0,2%, 0,4%, 2,0% i 4,0%) i NaOCl (2–10%) wykonano krążki wysycone wodnymi roztworami tych biocydów. Każdy test powtarzano dwukrotnie.

Inicjacji kultur nie objęto doświadczeniem ze względu na sukcesywne pobieranie wierzchołków inicjalnych i niewielką ich liczbę uzyskaną w różnych terminach. Doświadczenia nad wpływem biocydów wybranych na podstawie inicjalnie wykonanych testów odporności wyizolowanych bakterii prowadzono na etapie namnażania i ukorzeniania pędów pozyskiwanych z kultur 1- i 2-letnich. Antybiotyki dodawano do pożywki po autoklawowaniu, PPM przed autoklawowaniem. Prowadzono także doświadczenia nad

wpływem zakwaszenia pożywki na wzrost bakterii oraz ograniczaniem zanieczyszczeń bakteryjnych za pomocą biocydów w postaci roztworów wodnych w ilości 5 ml na słoik, podawanych na powierzchnię pożywki agarowej po umieszczeniu w niej pędów. W każdej kombinacji było od 5–10 słoików o pojemności 330 ml, zawierających po 6 pędów. Szczegółową metodykę poszczególnych doświadczeń podano przy tabelach z wynikami. Wyniki poddawano analizie statystycznej Anova, a różnice pomiędzy średnimi oceniano przy pomocy testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$, w układzie 1- lub 2-czynnikowym.

WYNIKI

Inicjacja kultur

Okolo 20% pędów zostało usuniętych na etapie inicjalnym z powodu zanieczyszczenia bakteriami lub grzybami. 34% pędów było wizualnie czystych, bez nekroz; pędy te przystosowały się do warunków kultury *in vitro*, rozpoczynając tworzenie pędów bocznych w 2–3 pasażu.

Izolacja i identyfikacja bakterii

Włączenie do pożywki inicjalnej albuminy mlecznej (źródła azotu organicznego) spowodowało szybsze ujawnianie się bakterii (wycieki do pożywki, halo wokół eksplantatu, kolonie rosnące na pożywce) i umożliwiło stopniową eliminację zanieczyszczonych kultur. W czasie monitorowania obecności bakterii w wizualnie czystych pędach inicjalnych wykładano ich dolne odcinki na pożywki bakteryjne, jednak na tym etapie nie stwierdzono obecności bakterii. Natomiast w kolejnych pasażach uzyskiwano wzrost bakterii z dolnych odcinków wizualnie czystych pędów na pożywkach NA i 523. Łącznie otrzymano cztery morfologicznie różne izolaty bakterii z odmiany ‘Polka’ i dwa z odmiany ‘Polana’. Konsekwentne prowadzenie selekcji przy każdym pasażowaniu spowodowało, że pozostało tylko po jednym izolacie – *Curto bacterium* sp. w odmianie ‘Polka’ i *Luteibacter* sp. w odmianie ‘Polana’.

Wrażliwość bakterii wyizolowanych z podstawy pędów maliny na biocydy

W tabeli 1 przedstawiono wyniki oceny wrażliwości/odporności na antybiotyki, wyrażone jako średnica zahamowania wzrostu kolonii po 24 i 48 godzinach. Całkowite zahamowanie wzrostu bakterii wszystkich izolatów powodowały erytromycyna ($30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i rifampicyna ($30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W kontakcie z PPM (0,4%) izolaty 1 i 2 rozpoczynały wzrost po 24 godzinach. Izolat 3 oraz izolat 5 były mniej wrażliwe na PPM, natomiast nie rosły w obecności cefotaksymu ($30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i chloramfenikolu ($30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Tabela 1. Wpływ biocydów na wzrost kolonii bakterii wyizolowanych z kultur *in vitro* maliny; (średnica zahamowania w cm, BW – brak wzrostu bakterii)Table 1. Effect of biocides on the growth of bacteria isolated from *in vitro* raspberry cultures (diameter of inhibition in cm, BW – no bacterial growth)

Biocyd Biocide (mg·dm ⁻³)	'Polka' izolat 1 (G+) (<i>Curtobacterium</i> sp.) 'Polka' strain 1		'Polka' izolat 2 (G-) 'Polka' strain 2		'Polka' izolat 3 (G-) 'Polka' strain 3		'Polka' izolat 4 (G-) 'Polka' strain 4		'Polana' izolat 5 (G-) (<i>Luteibacter</i> sp.) 'Polana' strain 5	
	po 24 h	po 72 h	po 24 h	po 72 h	po 24 h	po 72 h	po 24 h	po 72 h	po 24 h	po 72 h
	after 24 h	after 72 h	after 24 h	after 72 h	after 24 h	after 72 h	after 24 h	after 72 h	after 24 h	after 72 h
PPM 0,4%	BW	3,7	BW	4,1	2,5	2,5	BW	BW	2,7	2,7
C 30	4,1	4,1	BW	2,9	BW	BW	3,7	3,7	BW	BW
CAR 100	2,5	2,3	2,5	2,1	2,5	2,1	2,5	1,9	2,5	2,1
CN 10	2,5	BW	2,7	2,7	2,3	2,7	2,1	1,7	2,3	2,7
CTX 30	2,9	2,9	2,5	2,1	BW	BW	2,9	3,1	BW	BW
DO 30	3,1	3,3	3,1	3,7	2,9	2,9	3,1	3,1	2,9	2,9
E 30	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW
K 30	2,7	2,7	2,7	2,7	2,1	2,7	2,1	2,1	2,1	2,7
RD 30	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW	BW
TE 30	2,7	2,5	2,7	2,7	2,7	2,7	2,9	2,9	2,5	2,3
VA 30	3,7	4,5	3,1	2,5	3,1	2,7	3,1	3,3	3,1	2,7

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 2, porównywano wpływ biocydów na kultury maliny w czasie namnażania pędów. Eksplantaty do pasażu I pochodziły z kultur matecznych mnożonych na standardowej pożywce, bez dodatku biocydów. Materiał do pasażu II i III pochodził z wielopędów otrzymanych w pasażu I i II, a więc eksplantaty pasażowano na takich samych biocydach dwukrotnie. Pożywka w pasażu III nie zawierała biocydów. PPM włączony do pożywki zmniejszył namnażanie pędów 'Polki' tylko w I pasażu. W drugim pasażu nie stwierdzono różnic, co prawdopodobnie jest wynikiem przystosowania kultur do PPM. Parametry mnożenia pędów na pożywce z rifampicyną były podobne, jak w kontroli. W III pasażu nie stwierdzono następczego wpływu biocydów na namnażanie. Pędy 'Polany' reagowały podobnie, choć negatywny wpływ PPM na liczbę pędów w I pasażu dotyczył tylko wyższego stężenia. Liczba pędów 'Polany' była najwyższa na pożywce z rifampicyną, choć istotne różnice wystąpiły tylko w I pasażu.

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 3, testowano także inne biocydy, uznane za skuteczne. Jednak tobramycyna i cetrimid okazały się toksyczne dla maliny, całkowicie hamowały wzrost i namnażanie pędów oraz powodowały nekrozę 18% i 60% pędów ‘Polki’ i 51% i 83% pędów ‘Polany’. Wykazano, że korzystny wpływ na namnażanie pędów obu odmian miała erytromycyna. Pomimo największej liczby nowych pędów, co najmniej 50% było dłuższych od 1 cm, a więc mogło być przeznaczonych do ukorzenia. Tworzenie nowych pędów stymulował także dodatek do pożywki NaOCl, ale tylko 30% pędów ‘Polki’ było dłuższych niż 1 cm, u ‘Polany’ – 12%, a część pędów miała objawy nadmiernego uwodnienia. W tym doświadczeniu dodatek do pożywki 0,2% PPM nie spowodował obniżenia parametrów namnażania w porównaniu do kontroli.

Tabela 2. Wpływ biocydów na namnażanie pędów maliny odm. ‘Polka’ i ‘Polana’. Analiza statystyczna została wykonana oddzielnie dla odmian i pasaży, n = 36
Table 2. Effect of biocides on the shoot multiplication of ‘Polka’ and ‘Polana’ raspberries. Statistical analysis was done separately for cultivars and passages, n = 36

Kombinacja Treatment	Pasaż I; Passage I		Pasaż II; Passage II		Pasaż III; Passage III	
	liczba pędów shoot no.	% pędów > 1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów > 1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów > 1 cm % of shoots >1 cm
	‘Polka’					
Kontrola Control	3,9 a*	48,8 ab	5,0 a*	23,8 a	4,7 a	24,1 a
Rifampicyna 50 mg dm ⁻³	3,8 a	63,3 a	4,7 a	27,5 a	4,7 a	41,1 a
PPM 0,2%	2,4 b	18,2 c	4,1 a	30,8 a	5,1 a	43,8 a
PPM 0,4%**	2,0 b	39,0 bc	4,0 a	29,2 a	4,5 a	35,3 a
‘Polana’						
Kontrola Control	4,1 bc*	42,0 ab	4,9 a	40,5 a	4,1 a	41,5 ab
Rifampicyna 50 mg dm ⁻³	5,0 a	60,0 a	5,0 a	45,7 a	5,9 a	51,5 a
PPM 0,2%	4,8 ab	30,2 bc	4,6 a	22,5 a	5,3 a	42,7 ab
PPM 0,4%**	3,7 c	13,3 c	4,9 a	26,0 a	4,9 a	29,2 b

* widoczny wyciek bakterii w pożywce; visible bacteria leakage in the medium

** zdrobniałe liście; leaf miniaturization

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p = 0,05; Mean values marked with the same letter do not differ at the significance level p = 0.05

Tabela 3. Wpływ biocydów na namnażanie pędów maliny odmiany 'Polka' i 'Polana'. Analiza statystyczna wykonana oddzielnie dla odmian, n = 36
 Table 3. Effect of biocides on the shoot multiplication of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis was done separately for cultivars, n = 36

Biocydy Biocides	'Polka'			'Polana'		
	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	% pędów zamarłych % of died shoots	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	% pędów zamarłych % of died shoots
Kontrola Control	5,4 b	65,6 a	0	4,5 c	52,4 b	0
PPM 0,2%	5,9 b	66,0 a	0	4,5 c	66,2 a	0
NaOCl 0,4 ml·dm ⁻³	5,9 b	34,4 b	0	5,6 b	12,0 c	1
Tobramycyna 50 mg·dm ⁻³	1,1 c	6,4 c	18	1,1 d	0 c	51
Cetrymid 1 g·dm ⁻³	1,0 c	0 c	60	1,0 d	0 c	83
Erytromycyna 50 mg·dm ⁻³	6,7 a	69,0 a	0	6,8 a	53,2 b	0

Uwaga: patrz Tabela 2; Note: see Table 2

Tabela 4. Wpływ biocydów na namnażanie pędów maliny odmiany 'Polka' i 'Polana'. Analiza statystyczna wykonana oddzielnie dla odmian i pasaży, n = 25
 Table 4. Effect of biocides on the shoot multiplication of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis was done separately for cultivars and passages, n = 25

Biocydy Biocides	Pasaż I; Passage I				Pasaż II; Passage II			
	'Polka'		'Polana'		'Polka'		'Polana'	
	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm
Kontrola Control	4,5 bc	25,6 bc	4,5 b	30,2 a	5,8 a	39,4 bc	4,1 b	37,0 a
PPM 2,0%	4,1 c	20,8 bc	3,6 c	12,6 bc	4,3 b	34,0 c	4,6 b	44,2 a
CTX 100 mg·dm ⁻³	4,8 bc	37,4 ab	4,6 ab	19,0 ab	4,4 b	47,4 abc	4,8 b	42,4 a
CTX 100 mg·dm ⁻³ + PPM 0,2%	5,5 b	15,6 c	5,2 a	14,2 bc	5,0 ab	61,0 a	4,3 b	40,6 a
CTX 250 mg·dm ⁻³	6,9 a	44,6 a	5,3 a	5,0 c	5,2 ab	52,0 ab	5,7 a	33,2 a

Uwaga: patrz Tabela 2; Note: see Table 2

Tabela 5. Wpływ pH pożywki i zalewania pożywki agarowej wodnymi roztworami biocydów na namnażanie pędów maliny odmiany 'Polka' i 'Polana'. Analiza statystyczna wykonana oddzielnie dla odmian, n = 42

Table 5. Effect of medium pH and pouring of agar medium with biocide solutions on shoot multiplication of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis separately for cultivars; n = 42. Medium for shoot multiplication

Zalewanie pożywki agarowej Pouring of agar medium	pH po- żywki medium pH	'Polka'		'Polana'	
		liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm	liczba pędów shoot no.	% pędów >1 cm % of shoots >1 cm
Woda Water	5,7 4,0	4,7 ab 5,3 a	85,3 a 82,9 a	4,2 ab 3,8 b	59,7 abc 66,9 ab
Rifampicyna 50 mg·dm ⁻³	5,7 4,0	5,4 a 3,9 bc	66,1 b 60,6 b	5,2 a 3,9 b	71,3 a 60,4 abc
PPM 0,2%	5,7 4,0	4,1 bc 3,5 c	56,7 b 67,0 b	4,8 ab 4,7 ab	57,1 bc 63,3 abc
Rifampicyna 50 mg·dm ⁻³ + PPM 0,2%	5,7 4,0	4,2 bc 3,9 c	51,1 b 61,9 b	4,7 ab 4,7 ab	60,6 abc 51,4 c
pH	5,7 4,0	4,6 A 4,2 B	65,0 A 68,1 A	4,7 A 4,3 A	62,2 A 60,5 A

Uwaga: patrz Tabela 2; Note: see Table 2

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 4, w I pasażu wykorzystano pędy z kultur matecznych, rosnące na standardowej pożywce do namnażania, a w II – pędy pobrane z I pasażu. 0,2% PPM w pożywce hamował namnażanie pędów 'Polany', ale nie wpływał na ten parametr u 'Polki'. Cefotaksym (250 mg·dm⁻³) i cefotaksym (100 mg·dm⁻³) w połączeniu z PPM stymulował mnożenie pędów obu odmian maliny i wykazał pozytywny następczy wpływ w pasażu prowadzonym na pożywce bez biocydów.

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 5, obniżenie pH nie było korzystne dla namnażania pędów. Różnice były istotne w przypadku zalewania powierzchni roztworem rifampicyny. Najwięcej pędów uzyskano na pożywce o pH 5,7 zalewanej roztworem rifampicyny.

Dodatek PPM w stężeniu 0,4% hamował ukorzenianie i wydłużanie pędów, a także w mniejszym stopniu tworzenie korzeni odmiany 'Polka' (tab. 6). Z tego powodu kombinacja ta nie była brana pod uwagę w dalszych doświadczeniach. Wyraźnie korzystny był wpływ rifampicyny, ponieważ w tej kombinacji ukorzeniło się najwięcej pędów, tworzyło się najwięcej korzeni i pędy były najdłuższe, choć różnice były najczęściej nieistotne.

Zastosowane biocydy nie miały decydującego wpływu na ukorzenianie maliny. Potwierdził się korzystny wpływ rifampicyny, chociaż tylko w II serii liczba ukorzenionych pędów był istotnie wyższa dla 'Polki' (tab. 7). Na

pożywcze z tym biocydem ukorzeniło się najwięcej pędów (do 100%) i pędy wytworzyły najwięcej korzeni (do 7,5). Istotnie dłuższe pędy stwierdzono tylko u odmiany 'Polka' w pierwszej serii.

Tabela 6. Wpływ biocydów na ukorzenianie pędów maliny 'Polka' i 'Polana'. Analiza statystyczna była wykonana oddzielnie dla odmian, n = 36
Table 6. Effect of biocides on rooting of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis separately for cultivars; n = 36

Biocydy Biocides	'Polka'			'Polana'		
	% ukorze- nionych pędów % of rooted shoots	liczba ko- rzeni root no.	długość pędu (cm) shoot length (cm)	% ukorze- nionych pędów % of rooted shoots	liczba ko- rzeni root no.	długość pędu (cm) shoot length (cm)
Kontrola Control	91,5 a	6,5 a	4,5 a	77,8 a*	4,4 b	5,3 b
PPM 0,2%	75,2 ab	5,5 a	4,7 a	89,0 a	2,6 b	2,7 c
PPM 0,4 %	69,7 b	4,7 a**	3,7 a	94,3 a	3,4 b**	2,6 c
Rifampicyna 50 mg·dm ⁻³	91,7 a	6,9 a***	5,0 a	100 a	7,1 a***	4,6 a

* bakterie widoczne pod pędem i wokół pędu; bacteria below and around shoot base

** część korzeni nekrotycznych, wzrost mokrego kalusa u podstawy pędów; necrotic roots and wet callus at the shoot base

*** białe korzenie i duże, zielone liście; white roots and green large leaves

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p = 0,05; Mean values marked with the same letter do not differ at the significance level p = 0.05

Tabela 7. Wpływ biocydów na ukorzenianie pędów maliny odm. 'Polka' i 'Polana'. Analiza statystyczna wykonana oddzielnie dla odmian, n = 60 seria I oraz n = 36 seria II
Table 7. Effect of biocides on rooting of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis separately for cultivars; n = 60 S I and n = 36 S II

Biocydy Biocides	% ukorzenionych pędów % of rooted shoots		Liczba korzeni Root no.		Długość pędu (cm) Shoot length (cm)	
	seria I	seria II	seria I	seria II	seria I	seria II
'Polka'						
Kontrola	88,8 a	88,3 b	6,6 a	4,9 a	4,1 b	4,5 a
PPM 0,2%	94,3 a	83,2 b	6,5 a	5,8 a	4,0 b	4,9 a
Rif. 50 mg·dm ⁻³	100 a	98,3 a	6,9 a***	6,3 a***	5,1 a	4,9 a
'Polana'						
Kontrola	88,8 a	93,2 a	6,4 a	6,4 a	5,5 a	6,0 a
PPM 0,2%	94,3 a	93,2 a	6,9 a	6,0 a	4,3 b	5,4 a
Rif. 50 mg·dm ⁻³	100 a	100 a	7,5 a***	7,0 a***	5,6 a	5,6 a

Uwaga: patrz Tabela 6; Note: see Table 6

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 8, zastosowano kombinację obydwu biocydów, a podano je zarówno do pożywki agarowej, jak i w postaci roztworu na powierzchnię pożywki. Nie stwierdzono, aby dodatek wody lub roztworu biocydów zmieniał istotnie wyniki ukorzenia. Jedyny istotny wpływ biocydów stwierdzono dla długości pędów odmiany 'Polka'.

W doświadczeniu, którego wyniki przedstawiono w tabeli 9, badano wpływ biocydów oraz oddziaływanie kwasowości pożywki. Nie stwierdzono wpływu pH pożywki na parametry ukorzenia. Natomiast powtórzył się pozytywny, choć nieistotny statystycznie, wpływ rifampicyny na ukorzenie. Na pożywkach z dodatkiem rifampicyny ukorzeniały się wszystkie pędy, zarówno odmiany 'Polka', jak i 'Polana', a odmiana 'Polka' tworzyła także najwięcej korzeni na pożywkę o pH 4,0 z dodatkiem rifampicyny.

Ukorzone mikrosadzonki dobrze aklimatyzowały się w szklarni (80–100%, w zależności od stopnia ukorzenia). Mikrosadzonki ukorzone na pożywkę z dodatkiem rifampicyny wyróżniały się większymi liśćmi i często dłuższymi pędami. Jednak po 1–2 miesiącach różnice zacierają się (szczegółowych danych nie zbierano).

Tabela 8. Wpływ biocydów na ukorzenie pędów maliny odm. 'Polka' i 'Polana' podanych w pożywkę agarową i w roztworze na pożywkę agarową przed wyłożeniem pędów, n = 42

Table 8. Effect of biocides in the agar medium and poured on the agar medium on rooting of 'Polka' and 'Polana' raspberries. Statistical analysis separately for cultivars; n = 42

Kombinacje Treatments	'Polka'			'Polana'		
	% pędów ukorzenio- nych % of rooted shoots	liczba ko- rzeni root no.	długość pędu (cm) shoot length (cm)	% pędów ukorzenio- nych % of rooted shoots	liczba ko- rzeni root no.	długość pędu (cm) shoot length (cm)
Bez biocydów No biocides	97,6 a	6,3 a	4,2 b	95,1 a	5,6 a	4,6 a
Bez biocydów + woda na powierzchnię pożywki No biocides + water on the medium surface	95,1 a	6,6 a	4,3 b	93,1 a	5,6 a	5,2 a
Rif. 50 mg·dm ⁻³ + PPM 0,2% w pożywkę agarowej Rif. 50 mg·dm ⁻³ + PPM 0.2% in the agar medium	97,6 a	6,5 a***	5,5 a	95,1 a	6,0 a***	4,7 a
Jak wyżej + 5 ml Rif. 50 mg·dm ⁻³ + PPM 0,2% na powierzchnię pożywki As above + 5 ml Rif. 50 mg·dm ⁻³ + PPM 0.2% on the medium surface	100 a	6,6 a***	5,5 a	100 a	6,0 a***	5,5 a

Uwaga: patrz Tabela 2; Note: see Table 2

Tabela 9. Wpływ pH pożywki oraz biocydów na ukorzenie pędów maliny odm. 'Polka' i 'Polana', n = 36

Table 9. Effect of medium pH and biocides on rooting of 'Polka' and 'Polana' raspberries, n = 36

Kombinacje Treatments		'Polka'			'Polana'		
Biocydy Biocides	pH	% ukorze- nionych pę- dów	liczba korzeni	długość pędu (cm)	% ukorze- nionych pę- dów	liczba korzeni	długość pędu (cm)
		% of rooted shoots	root no.	length (cm)	% of rooted shoots	root no.	length (cm)
Bez biocydów	5,7	88,8 a	6,5 a	4,5 a	88,0 a	6,4 a	6,0 a
No biocides	4,0	97,2 a	7,9 a	4,7 a	88,1 a	7,0 a	5,0 a
PPM 0,2%	5,7	94,3 a	6,5 a	4,9 a	95,1 a	6,9 a	5,4 a
	4,0	91,5 a	6,1 a	4,8 a	95,1 a	7,0 a	5,2 a
Rifampicyna 50 mg·dm ⁻³	5,7	100 a	6,9 a	4,9 a	100 a	7,5 a	5,6 a
	4,0	98,3 a	9,2 a	4,8 a	100 a	7,0 a	5,6 a

Uwaga: patrz Tabela 2; Note: see Table 2

DYSKUSJA

Curtobacterium (G+) należy do bardzo zróżnicowanej morfologicznie i funkcjonalnie grupy systematycznej, której przedstawiciele są saprofitami lub patogenami roślin i człowieka. Bakteria była izolowana z kultur roślinnych i stwierdzono, że nie jest odporna na rifampicynę (np. Buckley i in. 1995). Jeden z izolatów tego gatunku otrzymany w minionych latach z kultur maliny okazał się pożyteczny dla kultur pędowych innych roślin (Zawadzka i in. 2013). Bakteria *Luteibacter* spp. (G-) była izolowana wcześniej z rizosfery jęczmienia i była także spotykana w kulturach roślinnych *in vitro* i określona jako wrażliwa na rifampicynę (Wakil i Mbah 2012).

Dodatek biocydów, przede wszystkim antybiotyków, do pożywek do mnożenia pędów *in vitro* był badany i wdrażany od dawna (Phillips i in. 1981; Pollock i in. 1983; Young i in. 1984; Leifert i in. 1992; Guri i Patel 1998). Dobór biocydów zależy z jednej strony od wrażliwości dominujących w roślinach bakterii, a z drugiej od braku toksyczności dla roślin. Zastosowanie biocydów w celach praktycznych na dużą skalę powinno być poprzedzone określeniem ich bakteriobójczości i fitotoksyczności. Wpływ biocydów na bakterie jest najczęściej sprawdzany w testach antybiogramów, gdzie miarą wrażliwości na biocyd jest wielkość średnicy zahamowania wzrostu bakterii. W przypadku bakterii wyizolowanych z kultur pędowych maliny ich wzrost był całkowicie zahamowany przez rifampicynę i erytromycynę, a na krótko także przez PPM, a wzrost *Luteibacter* hamował także cefotaksym. Te wła-

śnie biocydy zostały wybrane do badania fitotoksyczności. Najbardziej znanym biocydem włączanym do pożywek jest PPM (George i Tripeppi 2001; Compton i Koch 2001). Jest on na ogół nietoksyczny dla roślin, chociaż nie liczne rośliny są wrażliwe, np. *Arabidopsis* (Paul i in. 2001) i chryzantema odmiany 'Ludo' (Orlikowska i in. 2012). Malina odmiany 'Beskid' także reagowała na ten preparat mniejszą zdolnością do namnażania, a przy wyższych dawkach także ukorzeniania (Orlikowska i in. 2012). Ten preparat jest polecany przede wszystkim dla zabezpieczania kultur przed zakażeniem, natomiast nie zwalcza już istniejących zanieczyszczeń bakteryjnych. W tej pracy wykazano w niektórych doświadczeniach jego niewielki negatywny wpływ na namnażanie i ukorzenianie pędów 'Polki' i 'Polany'. Można założyć, że będzie przydatny jako dodatek do pożywek w mikrorozmnażaniu maliny (może nie w każdym pasażu), w stężeniu 0,2%. Jego wadą jest wysoka cena, więc celowe jest wypróbowanie innych biocydów, przede wszystkim antybiotyków, których cena jest niska, wadą natomiast jest konieczność podania ich do stygnącej pożywki po autoklawowaniu. W przeciwieństwie do PPM wiele antybiotyków wykazuje działanie fitotoksyczne, np. cefotaksym, w przeciwieństwie do karbenicyliny, był szkodliwy dla kultur pelargonii (Wojtania i in. 2005). W naszych doświadczeniach nie był toksyczny dla maliny, a w stężeniu $250 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ nawet stymulował namnażanie pędów. Innym zagadnieniem jest skuteczność antybiotyków. Najczęściej mają one charakter bakteriostatyczny, a nie bakteriobójczy, dodatkowo, w niewielkim stopniu przemieszczają się do górnych części pędu, co oznacza, że bakterie nie są widoczne w pożywce, ale pojawiają się w następnych pasażach, po wyłączeniu biocydów z pożywki. W odniesieniu do kultur gerbery stwierdzili to m.in. Podwyszyńska i Hempel (1987). Misra i in. (2010) donosili natomiast, że 2–3-krotne pasażowanie kultur *Jatropha* na pożywkę z augmentyną powodowało trwałe ograniczenie wzrostu bakterii *Enterobacter ludwigii*. W tej i innych pracach obserwacje najczęściej dotyczą jednego lub dwóch pasażów po antybiotykoterapii. W żadnym z naszych doświadczeń nie obserwowano bakterii, jeśli w pożywce były biocydy, natomiast w następnych pasażach bakterie wyciekały z pędów do pożywki, czasem w niewielkim stopniu. Jednak nawet w pożywce z biocydami pędy po wyłożeniu na pożywki bakteryjne wykazywały obecność bakterii. Nie stwierdzono skuteczności obniżenia pH pożywki w ograniczaniu wzrostu bakterii, choć w badaniach Leiferta i in. (1994) niskie pH hamowało wzrost bakterii w kulturach *Delphinium*.

Obecność bakterii endogennych w tkankach roślin mierzonych *in vitro* jest konsekwencją tego, że tkanki roślinne są ich naturalnym środowiskiem i nie da się tego uniknąć. Ich współżycie z roślinami ma różny charakter. Są wśród nich takie, które nie są w stanie rozmnażać się bez obecności tkanek roślinnych i takie, które mogą rozmnażać się np. na pożywkach do mnożenia roślin. Takie bakterie mogą niekiedy rozmnażać się nadmiernie i szkodzić

eksplantatom roślinnym. Jest to szczególnie częste w długo eksploatowanych kulturach. Aby można było takie mocno skolonizowane eksplantaty w dalszym ciągu rozmnażać, trzeba ograniczać ilość bakterii przez stosowanie biocydów w połączeniu z ostrą selekcją kultur szczególnie porażonych (Thomas 2004 a,b; Thomas i Prakash 2004).

WNIOSKI

1. PPM w stężeniu 0,2%, rifampicyna w stężeniu $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, erytromycyna w stężeniu $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz cefotaksym w stężeniu $250 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ włączone do pożywki do namnażania lub ukorzenia pędów maliny 'Polka' i 'Polana' nie są fitotoksyczne i mogą być polecane w mikrorozmnażaniu tych odmian.
2. Powyższe biocydy miały charakter bakteriostatyczny. Ograniczały namnażanie się bakterii *Curtobacterium* sp. i *Luteibacter* sp., powodując, że nie były one widoczne w pożywce z biocydami, ale po przeszczepieniu pędów na pożywkę bez biocydów bakterie namnażały się i były widoczne w pożywce.
3. Obniżenie pH pożywek z 5,7 do 4,0 nie miało wpływu na ukorzenie.

Literatura

- Anderson W.C. 1980. Tissue culture propagation of red raspberries and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horticulturae* 112: 13–20. DOI: 10.17660/actahortic.1980.112.1.
- Baranowska A., Radwańska K., Zarzecka K., Gugala M., Mystkowska I. 2015. Właściwości prozdrowotne owoców maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.). *Problemy Higieny i Epidemiologii* 96: 406–409.
- Buckley P.M., DeWilde T.N., Reed B.M. 1995. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 31: 58–64. DOI: 10.1007/bf02632229.
- Compton M.E., Koch J.M. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM)TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 259–261. DOI: 10.1007/s11627-001-0046-6.
- Daubeny H.A., Stace-Smith R., Freeman J.A. 1978. The occurrence and some effects of raspberry bushy dwarf virus in red raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 103: 519–522.
- FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Friesen M.L., Porter S.S., Stark S.C., von Wettberg E.J., Sachs J.L., Martinez-Romero E. 2011. Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 23–46. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039.
- GUS. 2016. Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2016.

- George M.W., Tripepi R.R. 2001. Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, European birch, and rhododendron. *HortScience* 36: 768–769.
- Guri A.Z., Patel K.N. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. United States Patent US5750402A.
- Herman E.B. 1990. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. *Acta Horticulturae* 280: 233–238. DOI: 10.17660/actahortic.1990.280.40.
- Leifert C., Camotta H., Waites W.M. 1992. Effect of combination of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 153–160. DOI: 10.1007/bf00033621.
- Leifert C., Ritchie J.Y., Waites W.M. 1991. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 452–469. DOI: 10.1007/bf00303371.
- Leifert C., Waites B., Keetley J.W., Wright S.M., Nicholas J.R., Waites W.M. 1994. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 149–155. DOI: 10.1007/bf00037713.
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings – International Plant Propagators’ Society* 30: 421–427.
- Misra P., Gupta N., Toppo D.D., Pandey V., Mishra M.K., Tuli R. 2010. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling of endophytic bacterial contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 189–197. DOI: 10.1007/s11240-009-9636-5.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Orlikowska T., Nowak K., Reed B. 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128: 487–508. DOI: 10.1007/s11240-016-1144-9.
- Orlikowska T., Sobiczewski P., Zawadzka M., Zenkteler E. 2010. Kontrola i zwalczanie zakażeń i zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach roślinnych *in vitro*. *Biotechnologia* 2(89): 57–71.
- Orlikowska T., Zawadzka M. 2006. Bakterie w kulturach tkanek roślinnych *in vitro*. *Biotechnologia* 4(75): 64–77.
- Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM™ and Vitrofuril on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 87: 223–230. DOI: 10.1080/14620316.2012.11512856.
- Paul A.-L., Semer C., Kucharek T., Ferl R.J. 2001. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabidopsis plants for a Space Shuttle flight experiment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 480–485. DOI: 10.1007/s002530000521.

- Phillips R., Arnott S.M., Kaplan S.E. 1981. Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters* 21: 235–240. DOI: 10.1016/0304-4211(81)90094-8.
- Thomas P. 2004a. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Science* 87: 67–72.
- Thomas P. 2004b. *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 173–179. DOI: 10.1023/b:ticu.0000016824.09108.c8.
- Thomas P., Prakash G.S. 2004. Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40: 603–607. DOI: 10.1079/ivp2004583.
- Thomas P., Swarna G.K., Patil P., Rawal R.D. 2008. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 39–54. DOI: 10.1007/s11240-008-9340-x.
- Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3073–3077. DOI: 10.1128/aem.66.7.3073-3077.2000.
- Podwyszynska M., Hempel M. 1987. Identification and elimination of “slowly growing” bacteria from a micropropagated gerbera. *Acta Horticulturae* 212: 112. DOI: 10.17660/actahortic.1987.212.17.
- Pollock K., Barfield D.G., Shields R. 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports* 2: 36–39. DOI: 10.1007/bf00269232.
- Quambusch M., Pirttilä A.M., Tejesvi M.V., Winkelmann T., Bartsch M. 2014. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology* 34: 524–533. DOI: 10.1093/treephys/tpu027.
- Reed B.M., Buckley P.M., DeWilde T.N. 1995. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 31P: 53–57. DOI: 10.1007/bf02632228.
- Rosenblueth M., Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827–837. DOI: 10.1094/mpmi-19-0827.
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 42: 206–214. DOI: 10.1079/ivp2006769.
- Shchelkunova S.E., Popov Yu.G. 1970. Production of virus-free raspberry plants from cultures of isolated apexes. *Soviet Plant Physiology (Fiziologiya Rastanii, English Translation)* 17: 513–516.

- Snir I. 1981. Micropropagation of red raspberry. *Scientia Horticulturae* 14: 139–143. DOI: 10.1016/0304-4238(81)90005-4.
- Sobczykiewicz D. 1984. Mass production of raspberry plantlets through micropropagation and rooting them directly in sand-peat mixture. *Fruit Science Reports* 11(2): 73–77.
- Sobczykiewicz D. 1992. Micropropagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 18: 339–353. DOI: 10.1007/978-3-642-76422-6_18.
- Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. 1991. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 27P: 42. DOI: 10.1007/bf02632060.
- Wakil S.M., Mbah E.I. 2012. Screening antibiotics for the elimination of bacteria from *in vitro* yam plantlets. *AU Journal of Technology* 16: 7–18.
- Wojtania A., Puławska J., Gabryszewska E. 2005. Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 101–108.
- Young P.M., Hutchins A.S., Canfield M.L. 1984. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. *Plant Science Letters* 34: 203–209. DOI: 10.1016/0304-4211(84)90143-3.
- Zawadzka M., Orlikowska T. 2006. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 145–149. DOI: 10.1007/s11240-005-9063-1.
- Zawadzka M., Trzciński P., Nowak K., Orlikowska T. 2013. The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on *in vitro* multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants. *Journal of Horticultural Research* 21: 41–51. DOI: 10.2478/johr-2013-0020.

Praca została wykonana w ramach zadania 1.5 Programu Wieloletniego „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.