



ISSN 1311-0489

Agricultural Academy

**JOURNAL
OF MOUNTAIN AGRICULTURE
ON THE BALKANS**

Volume 14

Number 4, 2011

Published by
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture
Troyan, Bulgaria

СРЕБЪРНИЯТ НИТРАТ, КАТО ЕФЕКТИВЕН АГЕНТ ЗА *IN VITRO* СТЕРИЛИЗИРАНЕ НА ВЕГЕТАТИВНИ ЕКСПЛАНТИ ОТ *TAXUS* *BACCATA* L.

О. Ибрахим¹, П. Герчева², Л. Начева², В. Иванова³

¹Отдел Градинарство, Аграрен Факултет, Университет Асиут, Асиут, Египет

²Институт по овощарство – Пловдив

³Факултет по лозарство и градинарство, Аграрен Университет – Пловдив

SILVER NITRATE AS AN EFFECTIVE AGENT FOR *IN VITRO* SURFACE-STERILIZATION PROTOCOL OF *TAXUS BACCATA* L. SHOOT EXPLANTS

O. Ibrahim¹, P. Gercheva², L. Nacheva², V. Ivanova³

¹Hort. Dept., Fac. Agric., Assiut University, Assiut, Egypt

²Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria

³Faculty of Viticulture and Horticulture, Agricultural Univ., Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Вегетативните връхчета от възрастни дървета *Taxus*, използвани като експлантите за въвеждане в *in vitro* култура, най-често са много заразени. Рутинно използваните протоколи не успяват да елиминират тази висока степен на контаминация. В настоящото проучване са оценени редица нови процедури за стерилизация. За целта е използван разтвор на сребърен нитрат (AgNO_3) в три концентрации – 0.1, 0.5 или 1.0%. Експлантите са третирани с всяка от тези концентрации за два интервала от време – 3 или 5 минути. В допълнение, част от експлантите, обработени по гореописания начин, са потапяни в 2.5% разтвор на калциев хипохлорит за 5 минути. Като контрола е използвана стандартната схема, успешно прилагана в нашата лаборатория за други дървесни видове. Тя включва потапяне на експлантите в 5% разтвор на калциев

SUMMARY

Vegetative shoot apices of *Taxus*, commonly used as explants for *in vitro* shoot cultures, particularly mature ones, are under high risk of contamination. The routinely used protocols proved unsuccessful to eliminate this high rate of contamination. In the present study, several disinfection treatments were evaluated.

Silver nitrate (AgNO_3) solution was prepared at three concentrations - 0.1, 0.5 and 1.0%. Explants were subjected to the three concentrations for two exposure durations – 3 and 5 minutes.

These treatments either were completed at this point or were followed by immersion of the explants in 2.5% solution of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ for 5 minutes.

As a control treatment, the standard sterilization procedure ordinarily used in our lab for other woody plants, was employed. This procedure included

хипохлорит $[Ca(OCl)_2]$ за 5 минути, последвано от трикратно изплакване със стерилна дестилирана вода. Така подготвените връхчета от всички тринадесет варианта са култивирани на хранителна среда WPM, обогатена с $1.64\mu M$ зеатин + $250mg\ l^{-1}$ казеин хидролизат (CH). Включването на $AgNO_3$ значително повишава ефикасността на стерилизацията в сравнение с контролата. Комбинирането на $AgNO_3$ с $Ca(OCl)_2$ спомага за съхраняване жизнеността на въведените в култура връхчета. Комбинираният вариант с 1.0% $AgNO_3$ за 3 минути намалява броя на заразените култури от *Taxus* до 20% с едновременно запазване жизнеспособността на 65% от експлантите.

Ключови думи: *Taxus baccata* L., калциев хипохлорит, in vitro, дезинфекция.

УВОД

Известно е, че по дървесните растения на открито има богата микрофлора и това затруднява стерилизацията им (Young и др., 1984). При *Taxus* са установени голям брой ендофитни микроорганизми (Stierle и др., 1995), които се отнасят към 300 гъбични и бактериални родове (Strobel и др., 2001). След въвеждане в култура на тъкани от *Taxus*, и по-специално от стари дървета, често се установява бактериална и гъбна зараза (Jaziri и др., 1996). В действителност това е основната причина, поради която изследователите срещат трудности при въвеждане на

immersion of the explants in a 5% solution of calcium hypochlorite $[Ca(OCl)_2]$ for 5 minutes, followed by three rinses with sterile distilled water.

Explants from the thirteen treatments were aseptically cultured on WPM-based medium supplemented with $1.64\mu M$ zeatin + $250mg\ l^{-1}$ CH. Involving $AgNO_3$ highly improved the efficacy of the sterilization process comparing to the control.

Combining $AgNO_3$ with $Ca(OCl)_2$ helped the explants keep their viability. Combined- $AgNO_3$ (1.0%) - 3min eliminated contamination of *Taxus* apical shoot culture to a considerable extent (20%) with high viability of explants (65%).

Key words: *Taxus* L., calcium hypochlorite, in vitro, disinfection

INTRODUCTION

Woody and mature plants growing in the open field are known to harbor a large amount of microflora and are very difficult to sterilize (Young *et al.*, 1984). *Taxus* plants have been found to be associated *in vivo* with a large number of endophytic microorganisms (Stierle *et al.*, 1995), which includes more than 300 fungal and bacterial genera (Strobel *et al.*, 2001).

After incubation of *Taxus* tissues, especially from older trees, bacterial and fungal contaminations are frequently observed (Jaziri *et al.*, 1996). Indeed, this is the main reason why several reviews have

вида в култура ин витро (Kulkarni, 2007).

Широко се използват дезинфектанти като натриев и калциев хипохлорит, етанол, живачен двухлорид, водороден перексид и сребърен нитрат. Има съобщения за прилагането и на други агенти за елиминиране на контаминацията при *in vitro* култури от *Taxus*. Nhut и съавтори (2007) съобщават за нисък процент (10%) заразени млади експлантите от тис след обработване със 70% етанол за 30 s и 1‰ HgCl₂. Противоположно на това Kulkarni и др. (2007) отбелязват, че са получили само 10%–20% чисти култури при използване на белина или HgCl₂. Подобни резултати са съобщени и от други автори за *Taxus* и за други растителни видове (Fett-Neto и др., 1992; Gibson и др., 1993 & 1995; Seki и др., 1995; Brukhin и др., 1996).

За преодоляване на високата степен на контаминация при въвеждане на *Taxus* в *in vitro* култура са прилагани и други процедури. Kulkarni и съавтори (2007) използват за *T. baccata* subsp. *wallichiana*, предтретиране на експлантите за една нощ с 25 mg l⁻¹ разтвор на офлоксацин, пefлоксацин и ципрофлоксацин, което драстично понижава процента на заразяване от 50% до 10%. Въпреки това, включването на антибиотици в хранителната среда може да

highlighted the difficulties in *in vitro* establishment of *Taxus* species (Kulkarni, 2000).

The disinfectants widely used are sodium hypochlorite, calcium hypochlorite, ethanol, mercuric chloride, hydrogen peroxide, silver nitrate. Some other disinfectants were reported for eliminating contamination in *in vitro* cultures of *Taxus*. Nhut *et al.* (2007) reported a low contamination (10%) when young explants of *Taxus* were disinfested with 70% ethanol for 30 s 1‰ HgCl₂.

By contrast, Kulkarni *et al.* (2007) reported that only 10%–20% of clean cultures were obtained when bleach or HgCl₂ sterilizes was used. Similar results were reported in *Taxus* and other different plants (Fett-Neto *et al.*, 1992; Gibson *et al.*, 1993 & 1995; Seki *et al.*, 1995; Brukhin *et al.*, 1996).

Other procedures have been developed to overcome the heavy contamination encounter *Taxus in vitro* culture. Kulkarni *et al.* (2007) suggested for *T. baccata* subsp. *wallichiana*, an overnight pretreatment of various explants in an aqueous solution with 25 mg l⁻¹ each of ofloxacin, pefloxacin, and ciprofloxacin which drastically reduced the contamination percentage from 50% to 10%. Nonetheless, antibiotics incorporated in nutrient media can lead to phytotoxic effects on

има фитотоксични ефекти върху експлантите.

В нашата лаборатория използваният стандартен протокол за дезинфекция чрез накисване в 5% разтвор на $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ за 5 минути също се оказва неуспешен за *Taxus* в сравнение с други изследвани видове. Нашите предходни изследвания с *Taxus* показват, че заразяването на експлантите при въвеждане в култура е много силно, независимо от сезона. Няколкократните опити за въвеждане в култура са компрометирани от високия процент контаминация и доведоха до загуби на култури. За получаване на стерилни *in vitro* култури е необходимо да се разработят алтернативни протоколи за контрол на замърсяването. В настоящото проучване са използвани различни процедури за дезинфекциране, включващи третиране с $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ и AgNO_3 . Информацията за използването на сребърен нитрат като дезинфектант при тъканните култури е много оскъдна.

Затова нашата цел е да предложим и проверим нови процедури за стерилизация на вегетативни експланти от възрастни дървета от *Taxus*, с участието на AgNO_3 и $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ в различни концентрации и период на въздействие.

explants.

In our laboratory, the commonly practiced surface sterilization procedures (a 5 min immersion in a 5% solution of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$) had proven to be relatively unsuccessful with *Taxus* comparing to that with other plant species studied.

Actually, our earlier studies showed that *in vitro* cultures of *Taxus* were under high risk of contamination, irrespective of the season of collection. Repeated incidence of high contamination in our previous trials led to a great loss, sometimes to running the cultures, during the establishment stage.

To obtain sterile *in vitro* cultures, it was necessary to develop alternative control strategies for the contaminants. In the present study, several disinfection treatments were evaluated involving calcium hypochlorite and/or silver nitrate. Scarce information is available about the use of silver nitrate as a disinfectant in *in vitro* shoot cultures.

Therefore, the objective of the present study was to propose and to verify new procedures of surface-sterilization of *Taxus* explants from old trees employing different combinations of AgNO_3 with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ in different concentration and periods of exposure.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експлантите – активно растящи връхчета – са събрани от 40 годишно дърво *Taxus baccata*. Игличките са подрязани и връхчетата скъсени до 1.5-2.5 cm. Всички експланти са промивани с течаща вода за 1 час, преди всички процедурите за дезинфекция. Стандартната стерилизация, използвана в нашата лаборатория (накисване в 5% разтвор на $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ за 5 минути) е използвана като контрола на останалите 12 третирания, включващи сребърен нитрат и/или калциев хипохлорит. Експлантите са потапяни във всяка една от трите концентрации на AgNO_3 (0.1, 0.5 and 1.0%) за 3 или 5 минути.

След това половината експланти са промити трикратно по 10 мин. със стерилна дестилирана вода и заложени на хранителната среда.

Другата половина е третирана допълнително с 2,5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ за 5 минути и отново трикратно промита със стерилна дестилирана вода.

Този вариант е обозначен като комбинирано със AgNO_3 третиране. Всички експланти са култивирани на основна хранителна среда WPM, съдържаща $1.64\mu\text{M}$ зеатин и $250\text{mg l}^{-1}\text{CH}$ и 5 g l^{-1} агар. За всеки вариант на третиране са заложени по 20 епруветки с по

MATERIAL AND METHODS

Explants – actively growing shoots – were collected from a 40-year-old *Taxus baccata* tree. The needles were trimmed and then 1.5-2.5 cm long shoot apices were prepared. All the explants were rinsed with running water for one hour before applying any of the disinfection procedures tested. The routine surface sterilization procedure used in our laboratory (immersion in a 5% solution of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ for 5 minutes) was employed as a general control comparing with other 12 disinfection treatments involving silver nitrate and/or calcium hypochlorite. Explants were treated by immersion in any of the three concentrations of AgNO_3 (0.1, 0.5 and 1.0%) for two exposure durations (3 and 5 minutes). After that, one half of the explants received three rinses with sterilized distilled water, 10 minutes each and then was cultured on the corresponding nutrient medium. The other half of the explants was rinsed only one time with sterile distilled water for 10 minutes and then exposed to 5 minutes immersion in 2,5% solution of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (shall be referred to hereinafter as the combined AgNO_3 treatments). All the explants were cultured in test tubes containing WPM medium supplemented with $1.64\mu\text{M}$ zeatin, $250\text{mg l}^{-1}\text{CH}$ and 5 g l^{-1} agar. Twenty tubes were assigned for

един експлант.

Микрорастенията са култивирани при температура $22\pm 2^\circ\text{C}$ и фотопериод 16h ден/8h нощ (флуоресцентни лампи OSRAM, 40W; $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD). Отчитани са процентът заразени експлант и тяхната жизнеспособност.

each treatments with a single explant contained in each tube. All cultures were kept at $22\pm 2^\circ\text{C}$ under 16-h photoperiod (fluorescent tubes OSRAM 40 W, $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD). Data on contamination percentage (%) and explant performance were regularly recorded.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Установени са значителни разлики между процедурите по отношение на процента на заразяване, вариращ от 15% до 90% (Таблица 1, Фигура 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Significant differences were detected among treatments with respect to contamination which ranged between 15% and 90% (Table 1, Figure 1).

Таблица 1. Процент на заразяване и жизнеспособност на експлантите от *T. baccata* L., след различни процедури за дезинфекция, включващи стандартна стерилизация с 5% калциев хипохлорит за 5 минути (контрола) и третирания със сребърен нитрат със или без калциев хипохлорит

Table 1. Contamination % and *in vitro* performance of shoot explants of *T. baccata* L. exposed to various disinfection procedures including the standard disinfection procedure with 5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ for 5 minutes (control) compared to newly developed procedures involving AgNO_3 with/without $\text{Ca}(\text{OCl})_2$

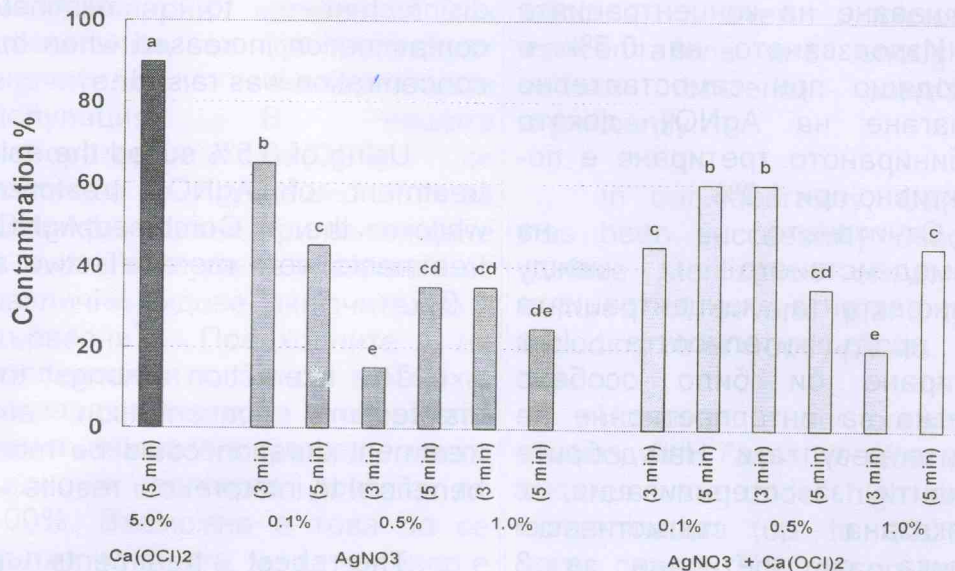
Disinfection treatment	Contamination %**				Explant performance			
	Disinfectant & concentration	Duration min.	After 1week	After 3wks	Total*	Necrosis %	Viable %	
							Of clean cultures	Of total cultures
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (control) 5.0%		5	75	15	90 ^a	34	66	10
AgNO_3 0.1%		3	50	15	65 ^b	33	77	20
		5	35	10	45 ^c	12	88	40
AgNO_3 0.5%		3	15	0	15 ^e	50	50	40
		5	25	10	35 ^{cd}	46	54	35
AgNO_3 1.0%		3	25	10	35 ^{cd}	55	45	25
		5	5	20	25 ^{de}	83	17	10
AgNO_3 0.1% + $\text{Ca}(\text{OCl})_2$		3	20	25	45 ^c	50	50	25
		5	25	35	60 ^b	25	75	30
AgNO_3 0.5%+ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$		3	50	10	60 ^b	0	100	40
		5	30	5	35 ^{cd}	54	46	30
AgNO_3 1.0%+ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$		3	15	5	20 ^e	19	81	65
		5	30	15	45 ^c	64	36	20

*Различните букви на всяка колона на взаимодействие показват съществена разлика по DMRT, $P < 0.05$

*Means within the same column with a common letter are not significantly different at 5% level using DMRT, $P \leq 0.05$.

**Процентът на заразяване е изчислен като отношение към първоначалния брой експланти. Всяко третиране е представено най-малко от 20 експланта в две повторения. Експлантите без видима контаминация са отчитани като жизнеспособни или некротирани (чисти, но некротирани).

**Contamination % was calculated relative to the total initial number of explants used. Each treatment comprised at least 20 explants in two replicates. Explants showing no detectable contamination by the fourth week were scored as viable or necrosis (clean but necrotized).



Фиг. 1. Процент на заразени на връхчетата от *T. baccata* L. след прилагане на различни процедури за стерилизация. Различните букви на всяка колона показват съществена разлика по DMRT, $P < 0.05$

Fig. 1. Total contamination % of shoot apex explants of *T. baccata* L. exposed to various disinfection procedures. Mean separation by DMRT, $P < 0.05$

При всички изследвани методи е отчетено значително ограничаване на заразяването в сравнение с контролата, при която е наблюдаван най-висок процент контаминация (90%).

Сред всички варианти на третиране по концентрации и продължителност, използването

Contamination was significantly limited due to any of the developed methods comparing to the control treatment which exhibited the highest contamination (90%).

Averaged over the concentrations and treatment durations, using the sole treatment

на AgNO_3 самостоятелно е най-ефективно в сравнение комбинирането с $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Като цяло най-ниската концентрация (0.1%) показва най-ниска ефикасност при контрола на контаминацията. Ефикасността на всеки от използваните дезинфектанти да елиминира контаминацията нараства при повишаване на концентрацията му. Използването на 0.5% е подходящо при самостоятелно прилагане на AgNO_3 , докато комбинираното третиране е по-ефективно при 1.0%.

Отчитането на взаимодействието между дезинфектанта, концентрацията и продължителността на третиране би било особено полезно за интерпретиране на нашите резултати. Най-добрите варианти за стерилизация, с недоказана статистически разлика, са третиране за 3 минути 0.5% AgNO_3 (само 15% заразени експланти), комбиниран 3мин. 1.0% AgNO_3 с $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (20% заразени експланти) и 5мин. 1.0% AgNO_3 (35% заразени експланти). За разлика от тях, 50 % заразяване е отчетено след три седмици при комбинираното третиране с най-ниската изследвана концентрация на AgNO_3 (0.1%) и 80% за AgNO_3 (1.0%) - 5 мин. Въпреки че контаминантите не са идентифицирани в настоящото изследване, би могло да се предполага

of AgNO_3 was generally more effective than the combined treatment with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$.

The lowest concentration (0.1%), overall, exhibited the least efficacy in controlling the contamination.

The ability of any of the used disinfectant to eliminate contamination increased when the concentration was raised.

Using of 0.5% suited the sole treatment of AgNO_3 treatment while the Combined- AgNO_3 treatments were more effective at 1.0%.

The interaction amongst the disinfectant, concentration and treatment duration could be more beneficial to interpret our results.

The best treatments in controlling the contamination, with no significant differences, were AgNO_3 (0.5%) – 3 min. (15%), Combined- AgNO_3 (1.0%) - 3min (20%) and AgNO_3 (1.0%) - 5min (35%).

Unlike the other treatments, approximately 50% of the contamination recorded for the Combined- AgNO_3 (0.1%), and 80% for AgNO_3 (1.0%) – 5min., took place later during the third week after the culture.

Although contaminants were not identified in the present study,

наличието на различни гъбни и бактериални патогени по специфичните цветове и форми на колониите, развиващи се по експлантите и хранителната среда.

Калциевият хипохлорит е широко използван дезинфектант, много ефективен срещу бактерии. Дори микромолярни количества са достатъчни, за да редуцират значително бактериалната популация. В нашата лаборатория $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ се използва успешно за дезинфекциране при въвеждане в *in vitro* култура на експлантите от различни видове, включително и дървесни. Предходните ни изследвания с *Taxus* показаха, че заразяването на експлантите при въвеждане в култура е много силно и понякога достига до 100%. Възможно е това да се дължи на факта, че като донор е използвано много старо дърво. В потвърждение на това са изследванията на Nhut и съавтори (2007), че експлантите от 45-дневни клонове от *Taxus* са 100% заразени след дезинфекциране със 70% етанол за 30 s и 1 ‰ HgCl_2 . Междувременно младите експлантите дават по-нисък процент зараза (10%), с по-добра преживяемост и развитие на нови пъпки. Друга причина за докладваните трудности във връзка с въвеждането в *in vitro* култура на видове от *Taxus* може

the presence of different fungal and bacterial contaminants could be inferred from various colors and shapes appeared in the contaminated cultures.

Calcium hypochlorite is a widely used disinfectant known to be a very effective killer of bacteria; even micromolar concentrations are enough to reduce bacterial populations significantly.

In our laboratory, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ has been successfully used for surface sterilization of *in vitro* cultures of several plant types, including other woody plants.

However, in our preliminary studies with *Taxus*, *in vitro* shoot cultures were under high risk of contamination (up to 100% in some cases). The reason beyond this could be the relatively old donor trees.

This is supported by the findings of Nhut *et al.* (2007) that explants from 45-day-old branches of *Taxus* were under high risk of contamination (100%) after disinfection with 70% ethanol for 30 s, 1 ‰ HgCl_2 .

Meanwhile, the young explants give a lower contamination (10%), with higher survival rate and shoot percentage.

да бъде установеният голям брой ендофитни бактерии и гъби при растенията от тис (Stierle и др., 1995; Kulkarni, 2007).

Настоящото изследване показва много добра ефективност на AgNO_3 като дезинфектант при въвеждане на вегетативни връхчета от *Taxus* в *in vitro* култура, въпреки оскъдната информация за използването му в такъв аспект. Някои изследователи препоръчват третиране на семената или заразени корени на много растения със сребърен нитрат, последвано от потапяне в разтвор на натриев хлорид за неутрализиране или преципитиране на среброто, например при фурми (Ahmed и Robinson, 1998), ечемик (Yun и др., 1994), заразени корени и надземни части на *Poa pratensis* (Raffle и Hsiang, 1998), корени на овес и пшеница (Carter и др., 1999). За дезинфекциране на връхни експланти Campbell и Tomes (1984) смятат, че и NaOCl , и AgNO_3 са ефективни за редуциране на заразяването и позволяват бърз растеж на връхчетата. Апексите, потопени в 1% AgNO_3 за 1 или 3 минути, имат нисък процент контаминация (15% и 10%, съответно) и добра жизнеспособност. Все пак, обаче, връхчетата, стерилизирани със сребърен нитрат, често покафявяват скоро след третирането им и имат

Another reason for the reported difficulties in *in vitro* establishment of *Taxus* species could be the large number of endophytic bacteria and fungi associated *in vivo* with *Taxus* plants (Stierle *et al.*, 1995; Kulkarni, 2007).

The present study showed a high efficacy of AgNO_3 as a disinfectant to *in vitro* shoot cultures of *Taxus*, though scarce information is available about the use of silver nitrate in this respect. Some investigators suggested treating seeds or diseased roots of many plants with silver nitrate followed by immersion in sodium chloride to neutralize or precipitate the silver, for example date fruits (Ahmed and Robinson, 1998), barely kernels (Yun *et al.*, 1994), diseased roots and crowns of *Poa pratensis* (Raffle and Hsiang, 1998), roots of oat and wheat (Carter *et al.*, 1999).

For disinfecting shoot explants, Campbell and Tomes (1984) assured that both NaOCl and AgNO_3 were effective in reducing contamination and allowing rapid growth of the shoot tip.

Shoot tips which were placed in AgNO_3 at a concentration of 1% for either 1 or 3 min had low contamination rates (15% and 10%, respectively) and high survival rates.

първоначален слаб растеж. Продължителното третиране със сребърен нитрат редуцира контаминацията, но понижава драстично преживяемостта на връхчетата. Поради това е изключително важно да се прецизира ефикасността на стерилизацията не само съобразно процента на заразяване и според жизнеността на дезинфекцираните експлантите. Балансът между концентрацията на дезинфекциращия агент и продължителността на третиране трябва да бъдат определени емпирично за всеки тип експлантите, поради възможна фитотоксичност. В представеното изследване ние определихме жизнеспособността на използвания растителен материал като процент на чистите култури към общия брой дезинфекцирани експлантите (Таблица 1). Използването на комбинирано третиране със AgNO_3 води, като цяло, до по-жизнеспособни експлантите, в сравнение със самостоятелното му приложение. Най-висок процент жизнеспособни експлантите са получени при комбинираното третиране с 1.0% AgNO_3 за 3 минути с елиминиране на контаминацията до 20%. От друга страна, жизнеспособността на експлантите при контролния вариант намалява до 10 % и варира от 10 – 25% при AgNO_3

However, shoot tips surface sterilized with silver nitrate turned brown soon after surface sterilization and initial growth was slow. Longer treatments in silver nitrate reduced contamination but also lowered the survival of shoot tips dramatically.

This why it is quite important to judge the efficacy of a surface sterilization treatment according to both the contamination percentage along with the performance of the disinfested explants.

A balance between concentration and time must be determined empirically for each type of explant because of phytotoxicity.

In the present study we determined the viability of the plant materials used as a percentage of the clean cultures or the total disinfested explants (Table 1). Using Combined- AgNO_3 resulted, generally, in higher viability than the sole AgNO_3 treatment.

The highest percentage of viable explants was obtained when Combined- AgNO_3 (1.0%) - 3min was applied.

The same treatment was noticed to eliminate contamination to 20%. Viability, on the other hand, decreased to 10% in the control and ranged from 10-25% in AgNO_3 (0.1%) - 3min, AgNO_3

(0.1%) -3 мин, AgNO₃ (1.0%) – 3 мин. и 5мин., Combined-AgNO₃ (0.1%) -3 мин. Този процент достига до 40% при вариантите със AgNO₃ (0.1%) -5 мин., AgNO₃ (0.3%) – 3 мин. и комбинирания вариант AgNO₃ (0.5%) 3мин с Ca(OCl)₂.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените в настоящото изследване резултати можем да препоръчаме комбинирания вариант AgNO₃ (1.0%) – 3 минути + Ca(OCl)₂ като най-подходящ по отношение на концентрации и продължителност на третиране. Това третиране намалява броя на заразените култури от *Taxus* до 20% с едновременно запазване жизнеспособността на 65% от експлантите.

Благодарности

Представеното изследване е подкрепено от програмата Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW), в рамките на проект 132878-EM-1-2007-BE-ERA Mundus-ECW.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Ahmed I.A., R.K. Robinson.** 1998. Selection of a Suitable Method for Analysis of Aflatoxins in Date Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 580-584.
2. **Brukhin V.B., I.R. Moleva, L.H. Filonova, V.P. Grakhov, Ya.B. Blume, P.V. Bozhkov.** 1996. Proliferative activity of callus cultures of *Taxus baccata* L. in relation to anticancer diterpenoid Taxol biosynthesis. *Biotechnol. Lett.*, 18: 1309-1314.
3. **Campbell C.T., D.T. Tomes.** 1984. Establishment and multiplication of red clover plants by *in vitro* shoot tip culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 3:49-57.
4. **Carter J.P., J. Spink, P.F. Cannon, M.J. Daniels, A.E. Osbourn.** 1999. Isolation, Characterization, and Avenacin Sensitivity of a Diverse Collection of Cereal-Root-Colonizing Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5): 3364–3372.
5. **Fett-Neto A.G., F. DiCosmo, W.F. Reynolds, K. Sakata.** 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug Taxol and related taxanes. *Nat.*

(1.0%) - 3min and 5min, Combined-AgNO₃ (0.1%) - 3min.

This percentage increased to reach 40% in each of AgNO₃ (0.1%) - 5min, AgNO₃ (0.3%) - 3min and Combined-AgNO₃ (0.5%) - 3min.

CONCLUSIONS

According to the results obtained in the present experiment we could recommend Combined-AgNO₃ (1.0%) - 3min as suitable disinfectant concentrations and period. This treatment could eliminate contamination of *Taxus* apical shoot culture to a considerable extent (20%) and led to high viability of explants (65%).

Acknowledgement

This research has been supported by Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW) programme, project number 132878-EM-1-2007-BE-ERA Mundus-ECW funded by the European commission.

6. **Gibson D.M., R.E.B. Ketchum, N.C. Vance, A.A. Christen.** 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew). *Plant Cell Rep.*, 12: 479-482.
7. **Gibson D.M., R.E.B. Ketchum, T.J. Hirasuna, M.L. Shuler.** 1995. Potential of plant cell culture for taxanes production. In: Suffness, M. (ed.), *Taxol® science and applications*. CRC Press, Boca Raton, Fla., USA, pp. 71–95.
8. **Jaziri, M., A. Zhiri, Y. Guo, J. Dupont, K. Shimomura, H. Hamad, M. Vanhaelen, J. Homes.** 1996. *Taxus sp.* cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46: 59-75.
9. **Kulkarni A.A., S.M. Kelkar, M.G. Watve, K.V. Krishnamurthy.** 2007. Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*. *Can. J. Microbiol.*, 53: 63–74.
10. **Murashige T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 - 497.
11. **Nhut D.T., N.T.T. Hien, N.T. Don, D.V. Khiem.** 2007. *In vitro* shoot development of *Taxus wallichiana* zucc., a valuable medicinal plant. In: Jain, S.M. and H. Häggman (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Springer, the Netherlands, pp. 107-116.
12. **Raffle V.L., T. Hsiang.** 1998. Low level of DNA polymorphisms in isolates of *Leptosphaeria korrae* pathogenic on *Poa pratensis*. *Can. J. Plant Pathol.*, 20:48-54.
13. **Seki M., M. Nakajima, S. Furusaki.** 1995. Continuous production of Taxol by cell cultures of *Taxus cuspidata*. *J. Chem. Eng.*, 28: 488-490.
14. **Stierle A.A., G. Strobel, D. Stierle, P. Grothaus, G. Bignami.** 1995. The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungus of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.*, 58: 1315–1324.
15. **Strobel G.A., A.A. Stierle, D.B. Stierle.** 2001. Taxol production by a microbe. US Patent: 6, 329, 193.
16. **Young P.M., A.S. Hutchins, M.C. Canfield.** 1984. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants. *Plant Sci. Lett.*, 34: 203–209.
17. **Yun S.J., I.S. Kwon, M.Y. Eun.** 1994. Expression of (1-3)- α -Glucanases in Developing and Germinating Barley Kernels. *Korean Biochem. J.*, 27 (1): 27-32.