

## ЭФФЕКТ АНТИБИОТИКОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

Концевая И.И.<sup>1</sup>, Цубер М.П.<sup>1</sup>, Вуевская И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины  
(г. Гомель, Беларусь)

<sup>2</sup>Гомельский государственный медицинский университет  
(г. Гомель, Беларусь)

В статье представлены материалы по изучению влияния некоторых добавленных в питательную среду антибиотиков на процесс регенерации узловых сегментов побегов различных клонов карельской березы на этапе мультипликации. Тестировали антибиотики: цефотаксим, карбенициллин, гентамицин, стрептомицин.

Определено негативное воздействие присутствия в питательной среде аминоглицозидных антибиотиков в тестируемых концентрациях на культуру тканей карельской березы. На этапе мультипликации при микроразмножении наиболее оптимальным является комбинированное применение  $\beta$ -лактамных антибиотиков в ростовой среде. Такой режим позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей в течение длительного периода времени, без негативного воздействия на морфометрические параметры регенерантов.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование культуры тканей карельской березы представляет большой интерес для специалистов-биотехнологов.

Во-первых, *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. – это редкая генетическая разновидность березы повислой (*B. pendula* Roth.), является значимой для деревообрабатывающей промышленности [1]. Республика Беларусь относится к странам с богатым естественным генетическим потенциалом и значительными ресурсами карельской березы. Однако в результате антропогенных и природных воздействий насаждения карельской березы с каждым годом уменьшаются [1]. По причине сложности искусственного размножения карельской березы для эффективного сохранения и массового воспроизводства ценных ее форм необходимо развивать и внедрять в производство методы микроклонального размножения, что невозможно без знаний о ее морфогенезе в культуре *in vitro*.

Во-вторых, для карельской березы установлена гетерогенность на молекулярном, хромосомном, клеточном, гистологическом, организменном уровнях, что проявляется в таких феноменах как мозаицизм и химеризм [2]. Ожидается, что эта исходная гетерогенность определяет появление новых фенотипических либо наследственных качеств под воздействиями модифицирующего или мутационного характера условий культивирования, включая компоненты питательной среды.

При микроклональном размножении следует учитывать проблему инфицирования пассируемого клонального материала микроорганизмами, что

прослеживается визуально. Контаминация клеточных культур возникает из внутренних тканей первичного экспланта, либо является обычно атрибутом недостаточной стерилизации первичного материала или неправильных приемов работы, либо вводится во время манипуляций в лаборатории [3].

Многолетняя природа древесных растений затрудняет получение стерильных культур [4]. Дальнейшее же культивирование таких тканей на богатых питательных средах стимулирует накопление микроорганизмов (спор микромицетов, бактерий, вирусов, фитофагов и т.д.) во внутренних межклеточных полостях, что, в итоге, приводит к проявлению инфекции спустя нечисло пассажей.

В практике микрклонального размножения антибиотики редко применяются для поверхностной стерилизации растительного материала, но необходимы, если инфицирование культуры связано с наличием микроорганизмов во внутренних полостях тканей. При добавлении антибиотиков в состав питательных сред важно знать их влияние на морфогенетический потенциал клеточного материала конкретного вида, сорта, клона растений. Это вызвано тем, что, по данным PhytoTechnology Laboratories (USA), чувствительность культуры тканей разных видов растений к одним и тем же антибиотиками может быть различной [5].

Цель исследования: изучение влияния некоторых добавленных в питательную среду антибиотиков на процесс регенерации узловых сегментов побегов различных клонов *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. на этапе мультипликации.

## МЕТОДИКА И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования использовали микрорастения клонов карельской березы: 76, 81 и 2а. В асептических условиях нарезали однопочечные сегменты побегов, длиной 0,7-1,0 см. Экспланты помещали на модифицированную среду WPM [6], в опыте дополненную антибиотиками. Тестировали следующие их концентрации: цефотаксим – 500 мг/л; карбенициллин – 500 мг/л; их совместную комбинацию; гентамицин – 100 и 300 мг/л; стрептомицин – 500 и 1000 мг/л.

При выборе концентраций антибиотиков исходили из информации PhytoTechnology Laboratories [5]. Стерильные растворы антибиотиков добавляли в асептических условиях в охлажденную до 45°C агаризованную среду. Материал культивировали в оптимальных для культуры тканей карельской березы условиях. Число растений в каждом варианте – 60.

Оценку материала проводили спустя 30 дней. Наличие/отсутствие бактериальной инфекции в растительном материале оценивали визуально по четырехбалльной шкале: «-» – отсутствие бактериальной инфекции, «+» – слабая вуаль в глубине питательной среды, «++» – сильная вуаль в глубине питательной среды, «+++» – сильная поверхностная инфекция. Учитывали процент эксплантов с признаками хлороза и некроза, способность их к побегообразованию.

Определяли морфологические параметры сформировавшихся микрорастений (высоту побегов, число листьев и корней, степень развития корней), массу микрорастений. Рост и развитие корней оценивали по трехбалльной шкале: 1 – слабое развитие корневой системы (наличие 1-5 корней с длиной не более 1 см); 2 – среднее развитие корней (наличие более 3 корней с длиной свыше 1 см, с единичными боковыми и придаточными корнями); 3 – сильное развитие корневой системы (наличие более 3 корней с длиной свыше 3 см, с развитыми боковыми и придаточными корнями).

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакета прикладного программного обеспечения «Statsoft (USA) Statistica v.7.0». Для сравнения изучаемых показателей между опытными и контрольными группами использовали t-критерий Стьюдента. Нулевую гипотезу отклоняли при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

Данные в тексте приведены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего арифметического.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что используемый материал карельской березы характеризовался накоплением в своих тканях бактериальной инфекции. Об этом свидетельствует наличие роста бактерий на поверхности и в глубине питательной среды контрольного варианта (таблица).

Таблица – Влияние антибиотиков на развитие микрорастений

Антибиотики, концентрация в мг/л	Инфицированность среды	Хлороз/некроз, %	Средняя высота растений, ( $x \pm S_x$ ), см	Корни	
				наличие, %	степень развития
клон 76					
WPM, б/г (контроль)	++	0/0	$4,5 \pm 0,30$	100	3
гентамицин, 100	-	100/0	$1,5 \pm 0,10$	0	0
гентамицин, 300	-	100/0	$1,1 \pm 0,08$	0	0
карбенициллин, 500	-	0/0	$3,6 \pm 0,22^*$	100	3, 2
цефотаксим, 500	-	0/0	$3,5 \pm 0,20^*$	100	3
цефотаксим, 500 + карбенициллин, 500	-	0/0	$3,6 \pm 0,18^*$	100	3, 2
клон 81					
WPM, б/г (контроль)	+++	0/0	$4,8 \pm 0,26$	100	3, 2
гентамицин, 100	-	10,0/0	$1,3 \pm 0,07^{**}$	0	0
гентамицин, 300	-	30,0/0	$1,2 \pm 0,05^{**}$	0	0
карбенициллин, 500	-	0/0	$3,7 \pm 0,22^*$	90,0	1, 3
цефотаксим, 500	-	0/0	$4,6 \pm 0,19$	100	3, 2
цефотаксим, 500 + карбенициллин, 500	-	0/0	$4,0 \pm 0,27$	100	3, 2
стрептомицин, 500	++	40,0/60,0	$1,1 \pm 0,07^{**}$	0	0
стрептомицин, 1000	-	100/100	$1,0 \pm 0,05^{**}$	0	0

клон 2а					
WPM, б/г (контроль)	+	0/0	$2,8 \pm 0,52$	100	2, 3
гентамицин, 100	-	0/30,0	$1,1 \pm 0,06^{**}$	0	0
гентамицин, 300	-	0/70,0	$1,0 \pm 0,03^{**}$	0	0
карбенициллин, 500	-	0/45,0	$1,6 \pm 0,25^*$	70,0	0, 3
цефотаксим, 500	-	0/40,0	$1,6 \pm 0,31^*$	100	3, 2
цефотаксим, 500 + карбенициллин, 500	-	0/45,0	$1,3 \pm 0,16^*$	70,0	0, 3
Примечание: уровень значимости при * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$					

При культивировании эксплантов на средах, дополненных гентамицином в концентрациях 100 и 300 мг/л, выявлено подавление процесса регенерации. У клонов 76 и 81 наблюдали хлороз, соответственно, в 100% и 10-30,0%. Выжившие экспланты характеризовались отсутствием роста побегов либо их минимальным развитием. Имеющиеся листья первичного экспланта теряли зеленую окраску, частично обесцвечивались, либо желтели, реже – опадали. Индукция корней отсутствовала у всех изученных клонов. У клона 2а отмечали некроз в 30-70%. Был установлен негативный эффект апробированных концентраций гентамицина на морфогенный статус узловых сегментов побегов карельской березы.

При культивировании эксплантов клона 81 на питательной среде, дополненной стрептомицином в концентрации 500 мг/л, отмечали незначительный рост у 40% однопочечных сегментов побегов, остальные экспланты не развились и некротизировали. Наблюдали появление в толще питательной среды незначительную контаминацию у оснований узловых сегментов побегов. Увеличение концентрации стрептомицина до 1000 мг/л в культуральной среде, подавляя рост бактерий, индуцировало развитие хлороза и некроза у всех эксплантов данного клона.

При использовании цефотаксима, карбенициллина и их совместной комбинации, не установлено их негативное воздействие на развитие эксплантов у клонов 76 и 81 (таблица). Наблюдали достаточно активный рост побегов в высоту, формирование зеленых листьев, стабильное корнеобразование. В большей мере действие  $\beta$ -лактамовых антибиотиков в ростовой среде установлено на показатель «средняя высота растений» и на изучаемые параметры ризогенеза. Чаще всего карбенициллин и цефотаксим, вызывая снижение числа корней на растении и уменьшение их длины, стимулировали формирование более мощных корней, чем в контроле. Однако следует подчеркнуть, что эффективность регенерации растений зависела, в первую очередь, от его генотипа. У клона 2а влияние  $\beta$ -лактамовых антибиотиков на регенерационные процессы можно оценивать как негативное (таблица).

Средняя масса микрорастений на средах, содержащих цефотаксим и/или карбенициллин, у клона 76 возрастала в 1,4 раза по сравнению с контролем, у клона 81 оставалась на уровне контрольного значения. У клона 2а установлено снижение данного показателя по сравнению с контролем более чем в 2-3 раза (рисунок).

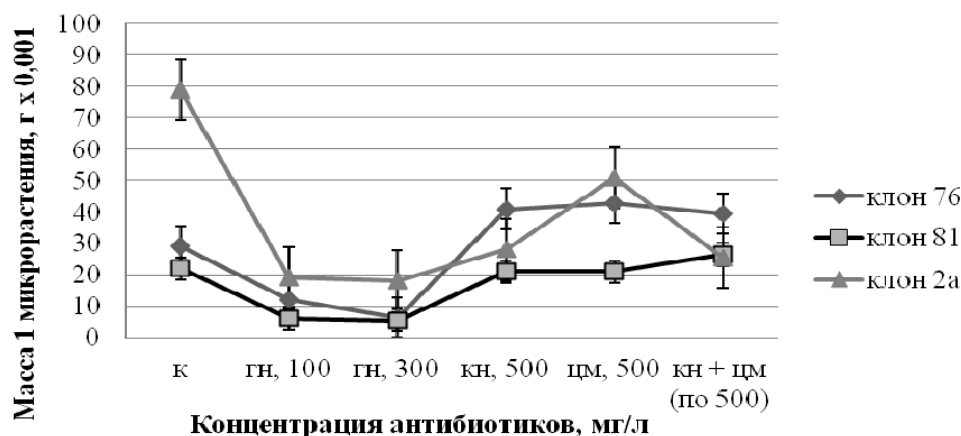


Рисунок – Влияние антибиотиков на массу одного регенеранта.  
 Обозначения вариантов: к – контроль; гн – гентамицин;  
 кн – карбенициллин; цм – цефотаксим

При последующем пассировании растительного материала на среду WPM была визуально оценена эффективность использования антибиотиков в среде прекультивирования для избавления от бактериальной инфекции. Наилучшие результаты показало применение карбенициллина и его комбинации с цефотаксимом. Появление бактериальной инфекции в данном случае наблюдали спустя 6-9 пассажей. При внесении только цефотаксима в состав среды инфицирование культуры регистрировали через 1-3 пассажей. По нашему мнению, использование антибиотиков при работе с тканевой растительной культурой является обязательным условием. Однако следует учитывать полифункциональность данного класса веществ, их токсичность на определенные виды микроорганизмов и их фитотоксичность.

Апробированные антибиотики в зависимости от механизма действия на бактериальную клетку делятся на несколько групп.  $\beta$ -лактамы (карбенициллин, цефотаксим) относятся к фармакотерапевтической группе: пенициллин полусинтетический, их объединяет наличие в структуре  $\beta$ -лактамного кольца [7]. Они действуют бактерицидно, подавляя синтез клеточной стенки бактерий. Эти антибиотики эффективны в относительно низких концентрациях, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот. Аминогликозидные антибиотики (гентамицин, стрептомицин) связываются с 30S-субъединицей рибосом, что прекращает биосинтез белка, и являются бактериостатическими антибиотиками широкого спектра действия. Они широко используются в опытах по генетической трансформации растений [8].

Исследования по влиянию антибиотиков на клеточные культуры различных сельскохозяйственных растений довольно многочисленны. В работе Дунаевой С.Е. и Оследкина Ю.С. представлен обзор по идентификации бактериальных микроорганизмов, колонизировавших ткани растений в культуре *in vitro*, их возможной роли и антибактериальной терапии [9]. При обсуждении результатов текущего эксперимента следует подчеркнуть, что действие

стрептомицина вызывает хлорофиллдефектность, в том числе в результате мутационных изменений, и на других культурах [10, 11]. Имеются сведения о влиянии антибиотиков на клеточном и молекулярном уровнях. В частности, в культуре тканей пшеницы, бензилпенициллин активирует пролиферацию клеток, ускоряя клеточный цикл, что ведет к усилению мутагенеза за счет повреждения хромосом. В то время как цефотаксим ингибирует пролиферацию клеток пшеницы, удлиняя клеточный цикл в период метафазы и индуцируя мутации за счет повреждения хромосом и митотического аппарата [12].

При использовании антибиотиков на этапах микроразмножения лесных древесных растений было показано, что отдельный антибиотик не был эффективен против эндогенной бактериальной инфекции [13], имеются сведения о появлении устойчивых штаммов бактерий [14]. По-видимому, это имело место и в нашем эксперименте в вариантах с использованием цефотаксима или карбенициллина. Оба антибиотика принадлежат к одной группе  $\beta$ -лактамных антибиотиков и, несомненно, спектр их действия на многие виды и штаммы бактерий пересекается. Использование комбинации нескольких антибиотиков из разных фармакологических групп в составе питательной среды при работе с культурой тканей растений является более эффективным [14]. Тем не менее, в этом случае сохраняется риск увеличения соматической изменчивости у регенерантов [4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Тестируемые концентрации аминогликозидных антибиотиков вызывают у всех эксплантов карельской березы хлорофиллдефектность.

2. На этапе мультипликации при микроразмножении карельской березы наиболее оптимальным является комбинированное применение  $\beta$ -лактамных антибиотиков в ростовой среде. Такой режим позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей в течение длительного периода времени, без негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений, эффективность регенерации которых зависит от генотипа.

3. Для выявления негативного влияния компонентов питательной среды при размножении клонов карельской березы необходимо проводить регулярное тестирование по морфологическим показателям выборочных экземпляров отдельных микроклонов, культивированных *in vitro*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ветчинникова, Л.В. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство / Л.В. Ветчинникова [и др.] – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. – 312 с.

2. Машкина, О.С. Использование методов биотехнологии в лесной генетике, селекции и сохранении генофонда / О.С. Машкина, Ю.Н. Исаков // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2003. – Вып. 59. – С. 149-153.

3. Leifert, C. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-growth plants: reasons for contamination problems in vitro / C. Leifert [et al.] // Crit. Rev. Plant Sci. – 1994. – Vol. 13. – P. 139-182.
4. Gogoi, G. Standardization parameters for critical problems encountered in plant in vitro culture technique / G. Gogoi, P.K Borua // International Journal of Current Research. – 2014. – Vol. 6. – Issue 12. – P. 10964-10973.
5. Antibiotics // PhytoTechnology Laboratories [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: <http://phytotechlab.com/index.php/biochemicals/antibiotics> – Дата доступа: 19.02.2016.
6. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – № 30. – P. 421-427.
7. Chandra, S.P. The Stimulatory Effects of the Antimicrobial Agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on *In Vitro* Plant Regeneration of *Centella asiatica* (L.) / S.P. Chandra, D.N.M. Manikyam, V.N. Challagundla // An Important Antijaundice Medicinal Plant American Journal of Plant Sciences. – 2014. – № 5. – P. 279-285.
8. Padilla, I.M.G. Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols / I.M.G. Padilla, L. Burgos // Plant Cell Rep. – 2010. – Vol. 29. – P. 1203-1213.
9. Дунаева, С.Е. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре in vitro: идентификация и возможная роль / С.Е. Дунаева, Ю.С. Оследкин // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 5, №1. – С. 3-15.
10. Gilbert, J.E. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures / J.E. Gilbert, S. Shohet, D.S. Caligari // Annals of Applied Biology. – 1991. – Vol. 119, № 1. – P. 113-120.
11. Яронская, Е.Б. Влияние кинетина на активность начальных этапов биосинтеза хлорофилла в обработанных стрептомицином проростках ячменя/Е.Б. Яронская [и др.] // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 440-448.
12. Редикин, Ю.В. Цитогенотоксические эффекты бета-лактамовых антибиотиков. Сообщение 1. Тест на индукцию повреждения митотических хромосом в клетках корневой меристемы пшеницы / Ю.В. Редикин [и др.] // Учен. Зап.биол.фак. ОмГПУ. – 1996. – № 5. – С. 77-92.
13. Mentzer, J. Effect of antibiotics on internal bacterial contamination of micropropagation hazelnut / J. Mentzer, P. Tanprasert // In Vitro Cell and Dev. Biol. Anim. – 1996. – Vol. 32, № 3, Pt. 2. – P. 74A.
14. Dodds, J.H. Experiments in plant tissue culture. Aseptic techniques / J.H. Dodds, L.W. Roberts // Cambridge: Cambridge Univ. Press. U.K. – 1982. – 24 p.

## THE EFFECT OF ANTIBIOTICS ON REGENERATION IN THE TISSUE CULTURE OF KARELIAN BIRCH

*Kontsevaya I.I., Tcuber M.P., Vuyevskaya I.V.*

*Revealed negative influence of the presence in the culture medium gentamicin at concentrations of 100 and 300 mg/l and streptomycin at concentrations of 500 and 1000 mg/l in tissue culture of birch. During the phase of multiplication of the shoots of Karelian birch is the most optimum is the combined use of  $\beta$ -lactam antibiotics in the growth medium. This mode allows you to maintain a visually clean tissue culture over a long period of time, without any negative impacts on morphometric parameters of microplants.*

Статья поступила в редколлегию 22.04.2016 г.



УДК 630\*232.32

## ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ СОСТАВОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

**Копытков В.В.<sup>1</sup>, Боровков А.В.<sup>1</sup>, Кондратенко О.В.<sup>1</sup>,  
Потапенко М.В.<sup>1</sup>, Копытков В.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

(г. Гомель, Беларусь)

<sup>2</sup>ГУО «Гомельский инженерный институт» МЧС РБ

(г. Гомель, Беларусь)

*Представлены результаты исследований применения композиционных полимерных составов при выращивании посадочного материала хвойных пород. Установлены оптимальные концентрации полимерного связующего и целевых добавок для предпосевной обработки семян. Определена эффективность использования различных препаратов при выращивании сеянцев сосны обыкновенной.*

### ВВЕДЕНИЕ

Значительные объемы лесокультурных работ обуславливают необходимость выращивания стандартного посадочного материала. Процесс выращивания сеянцев является сложным и трудоемким и требует выполнения большого числа агротехнических и технологических операций, от которых зависит эффективность производства посадочного материала [1, 2]. Она может быть в значительной степени повышена за счет использования композиционных составов для предпосевной обработки семян.