

ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА ЭТАПЕ МУЛЬТИПЛИКАЦИИ ПРИ КЛОНИРОВАНИИ *BETULA OBSCURA* KOTULA EX FIEK

Концевая И.И.

*Концевая Ирина Ильинична - кандидат биологических наук, доцент,
кафедра ботаники и физиологии растений,
Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины, г. Гомель, Республика Беларусь*

Аннотация: в статье исследуется влияние антибиотиков гентамицина, карбенициллина и цефотаксима, добавленных в питательную среду, на процесс регенерации узловых сегментов побегов *Betula obscura* на этапе мультипликации при клональном размножении.

Ключевые слова: антибиотики, клональное микроразмножение, береза.

Betula obscura Kotula ex Fiek (береза чернокорая) произрастает в Украине, России, Польше, Чехии, Словакии. В Беларуси встречается сравнительно редко. На территории республики выявлено свыше 30 местонахождений в 12 физико-географических районах [1]. Для *B. obscura* характерна высокая декоративность древесины, что делает ее экономически важной культурой. Для сохранения и размножения березы чернокорой в том числе актуально применение метода культуры тканей.

При разработке способа микроразмножения березы чернокорой перед нами встал вопрос о периодической контаминации лабораторного материала [2]. Использование антибиотиков для предотвращения микробной контаминации культуры тканей растений на длительный период культивирования имеет определенные ограничения [3]. По данным PhytoTechnology Laboratories, чувствительность культуры тканей разных видов растений к одним и тем же антибиотиками может быть различной [4]. Однако если исследования по воздействию антибиотиков на клеточные культуры сельскохозяйственных растений активно проводятся не одно десятилетие, то в культуре древесных растений использование антибиотиков ограничивается обычно генно-инженерными технологиями.

Цель исследования – изучение влияния некоторых добавленных в питательную среду антибиотиков на процесс регенерации узловых сегментов побегов *B. obscura* при клональном размножении.

В качестве объектов исследования использовали микрорастения клона ч1 березы чернокорой. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей, оптимизированная для древесных (WPM) [5]. Тестировали следующие антибиотики: цефотаксим (цм); карбенициллин (кн); гентамицин (гн). При выборе концентраций антибиотиков исходили из информации, предлагаемой PhytoTechnology Laboratories [4]. В качестве контроля использовали модифицированную среду WPM, без гормонов (WPM, б/г). Материал культивировали в оптимальных условиях. Чистоту растительного материала и оценку сформировавшихся микрорастений-регенерантов спустя 30 дней выполняли аналогично работе [6].

Проведенные исследования свидетельствуют, что исходная культура березы чернокорой была инфицирована. Об этом указывает сильный рост бактерий на поверхности питательной среды в контрольном варианте и на среде, дополненной цефотаксимом. По-нашему предположению, отсутствие антибактериального эффекта цефотаксима может свидетельствовать о формировании устойчивых штаммов бактерий к данному антибиотику, поскольку он периодически применялся в составе питательных сред для поддержания коллекции растений *in vitro*.

Не установлено негативное воздействие на развитие эксплантов у клона ч1 при использовании цефотаксима или карбенициллина, при этом совместное их применение значительно подавляет рост побега (таблица 1).

При культивировании микрорастений на средах, дополненных гентамицином в концентрациях 100 или 300 мг/л, установлено сдерживание процесса регенерации. Наблюдали хлороз листьев. Не выявлена индукция корней (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние антибиотиков на развитие микрорастений

Антибиотики, концентрация в мг/л	Инфицированность среды	Хлороз/некроз, %	Средняя высота растений, см	Корни	
				наличие, %	степень развития
WPM, б/г (контроль)	++	0/0	3,9±0,18	100	2, 1
гентамицин, 100	-	100/0	1,0±0,10*	0	0
гентамицин, 300	-	100/0	0,9±0,08*	0	0

карбенициллин, 500	-	0/0	3,7± 0,43	100	2, 1
цефотаксим, 500	+	0/0	3,5± 0,19	100	1, 2
цефотаксим, 500+ карбенициллин, 500	-	0/0	2,0±0,15*	100	2, 1
*Отличия от контроля значимы при P < 0,05.					

При действии β-лактамов коэффициент мультипликации у клона ч1 снижался по сравнению со значением контрольного варианта, с 4,5 до 2,8-3,7. При культивировании эксплантов на средах, дополненных гентамицином, коэффициент мультипликации не превышал 1 (рисунок 1).

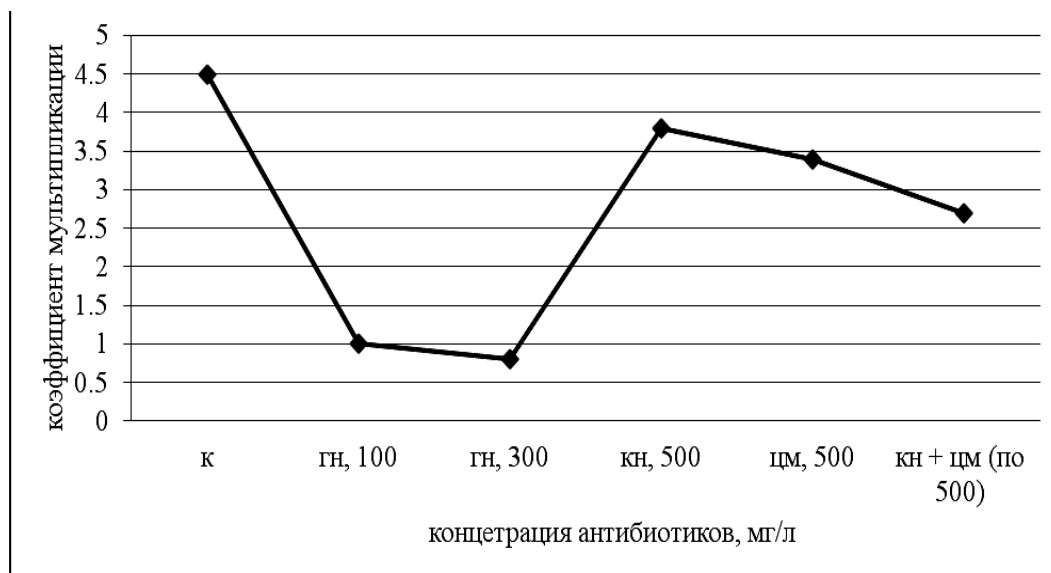


Рис. 1. Влияние антибиотиков на коэффициент мультипликации

Средняя масса микрорастений на средах, содержащих карбенициллин, у клона ч1 возрастала в 1,2 раза по сравнению с контрольным значением (рисунок 2). Тестируемые концентрации гентамицина существенно подавляли рост и развитие эксплантов, что сказалось на уменьшении массы микрорастений по сравнению с контролем более чем в 3-7 раз.

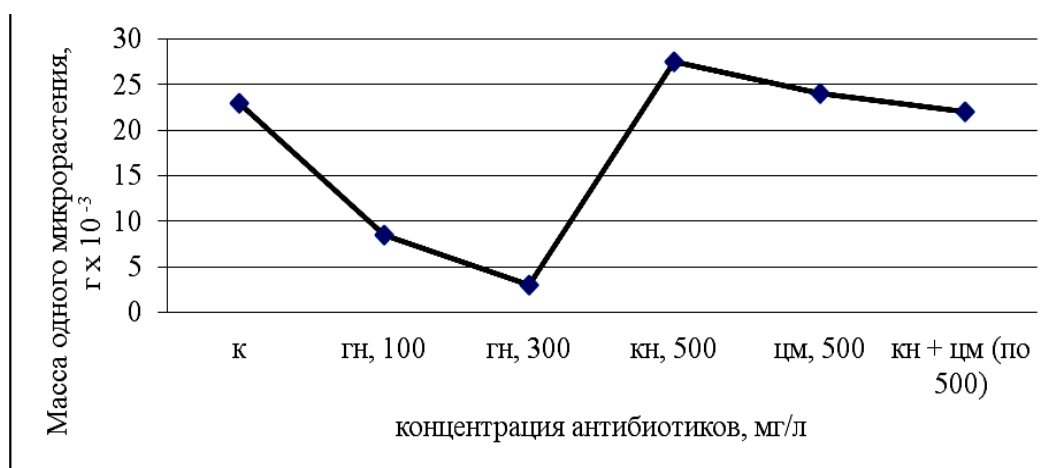


Рис. 2. Влияние антибиотиков на массу одного регенеранта

При последующем субкультивировании растительного материала на безгормональные среды была визуально оценена эффективность использования антибиотиков для получения стерильной культуры. Лучшие результаты на рост и развитие регенерантов клона ч1 показало применение карбенициллина или цефотаксима.

При использовании антибиотиков на этапе мультипликации клонального размножения древесных растений было выявлено, что отдельный антибиотик не был действенен против эндогенной бактериальной инфекции [7]. Причины такого негативного эффекта разнообразны [8]. Комбинация

нескольких антибиотиков намного эффективнее. При длительном наблюдении это имело место и для нашей коллекции клонов в вариантах с использованием цефотаксима или карбенициллина.

Таким образом в результате выполнения эксперимента установлено:

1 негативное воздействие присутствия в питательной среде гентамицина в концентрации 100 и 300 мг/л на культуру тканей клона ч1 березы чернокорой;

2 на этапе мультипликации при микроразмножении наиболее оптимальным является добавление в питательную тестируемых β -лактамных антибиотиков: карбенициллина и цефотаксима (в концентрации 500 мг/л). Указанные режимы позволяют поддерживать визуально стерильную культуру тканей, без негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений и их жизнеспособность;

3 при работе с культурой клеток и тканей березы чернокорой для поддержания ее стерильности в течение длительного периода времени следует придерживаться концепции совместного применения нескольких видов антибиотиков, с разным спектром действия на микроорганизмы. Не рекомендуется использовать антибиотики в каждом пассаже при рутинном размножении.

Работа выполнена при поддержке ГПНИ (№ темы М16-33).

Список литературы

1. *Побирушко В.Ф.* Перспективы хозяйственного использования редких видов берез Беларуси в контексте сохранения их генетических ресурсов // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений. Сб.н.тр. Вып. 59. Гомель, 2003. С. 153-156.
2. *Концевая И.И., Яцына А.А.* Микроразмножение *Betula obscura* Kotula ex Fiek // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология: матер. межд. конф. Минск, 24-26 ноября, 2004 г. Минск, 2004. С. 236-238.
3. *Дунаева С.Е., Оследкин Ю.С.* Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре in vitro: идентификация и возможная роль // Сельскохозяйственная биология, 2015. Т. 5. № 1. С. 3-15.
4. Antibiotics // PhytoTechnology Laboratories. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://phytotechlab.com/index.php/biochemicals/antibiotics/> (дата обращения: 19.02.2016).
5. *Lloyd G., McCown B.* Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 1980. № 30. P. 421-427.
6. *Концевая И.И., Жадько С.В.* Эффективность применения антибиотиков на этапе мультипликации при клонировании березы // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, 2016. № 6 (99). С. 24-30.
7. *Mentzer J., Tanprasert P.* Effect of antibiotics on internal bacterial contamination of micropropagation hazelnut // In Vitro Cell and Dev. Biol. Anim., 1996. Vol. 32. № 3. Pt. 2. P. 74A.
8. *Dodds J.H., Roberts L.W.* Experiments in plant tissue culture. Aseptic techniques // Cambridge: Cambridge Univ. Press. U.K., 1982. 24 p.