

УДК 577.18:581.16:582.632.1

AGRIS: H01

**ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
BETULA PENDULA VAR. *CARELICA* MERCKL.**

**USE OF ANTIBIOTICS TO OPTIMIZE MICROPROPAGATION OF *BETULA PENDULA*
VAR. *CARELICA* MERCKL.**

©**Концевая И. И.**,

канд. биол. наук,

Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,

г. Гомель, Беларусь, ikantsavaya@mail.ru

©**Kontsevaya I.**,

Ph.D., Francisk Skorina Gomel State University,

Gomel, Belarus, ikantsavaya@mail.ru

Аннотация. В работе исследуется зависимость регенерационной способности однопочечных сегментов побегов *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. от наличия некоторых антибиотиков в питательной среде.

Методы исследования: культура клеток *in vitro*, статистический анализ.

На этапе мультипликации в культуре *in vitro* карельской березы с использованием в качестве эксплантов однопочечных сегментов побегов оптимальным является применение β-лактамных антибиотиков. Добавление в питательную среду карбенициллина (500 мг/л) и/или цефотаксима (500 мг/л) позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей, без существенного негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений и их жизнеспособность.

Abstract. Dependence of the regenerative capacity of single-bud segments of *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. shoots on the presence of some antibiotics in a nutrient medium is discussed in the paper.

Methods: cell culture *in vitro*; statistical analysis.

β-lactam antibiotics are optimal at the stage of multiplication of Karelian birch *in vitro* with use of single-bud shoot segments as explants. Addition of carbenicillin (500 mg/l) and/or cefotaxime (500 mg/l) to the growth medium allows to support visually clean tissue culture with no significant negative impact on morphometric parameters and viability of micro-plants.

Ключевые слова: регенерационная способность, культура *in vitro*, антибиотики, береза.

Keywords: regenerative capacity, culture *in vitro*, antibiotics, birch.

Наиболее активно проводятся исследования по культуре ткани у *Betula pendula* Roth. и ее генетической разновидности — карельской березы (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.) [1], которая представляет интерес для деревообрабатывающей промышленности. Ее древесина из-за своей узорчатости является очень ценной, особенно в странах Северной и Центральной Европы. Беларусь относится к странам с богатым естественным генетическим потенциалом и значительными ресурсами карельской березы. Тем не менее, в результате

антропогенных и природных воздействий, биологических особенностей породы, насаждения карельской березы с каждым годом уменьшаются [2].

Для эффективного сохранения и массового воспроизводства ценных форм карельской березы необходимо развивать и внедрять в производство метод культуры клеток *in vitro*. При этом на всех этапах клонального размножения необходимо уделять внимание возможности получения и поддержания стерильного материала. Инфицирование клеточных культур возникает по разным причинам. Многолетняя природа древесных растений усугубляет их состояние при получении стерильных культур. В практике микроклонального размножения для поверхностной стерилизации растительного материала редко применяются антибиотики, но добавляются в состав питательных сред. Исследователю 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 антибиотикам может быть различной (1). Однако, если исследования по воздействию антибиотиков на клеточные культуры сельскохозяйственных растений довольно многочисленны и активно проводятся не одно десятилетие [3], то в культуре древесных растений использование антибиотиков чаще ограничивается генно-инженерными технологиями.

Цель исследования — изучение эффекта некоторых добавленных в питательную среду антибиотиков на процесс регенерации узловых сегментов побегов различных клонов *Betula pendula* var. *carelica* Merckl. на этапе мультипликации при клональном размножении.

Материал и методика.

В качестве объектов исследования использовали микрорастения клонов карельской березы: 76, 81, 2а.

Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей, оптимизированная для древесных (WPM) [4]. Тестировали следующие антибиотики: цефотаксим (цм) (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь); карбенициллин (кн) (ЗАО «Брынцалов-А», Россия); гентамицин (гн) (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), стрептомицин (ЗАО «Брынцалов-А», Россия). При выборе концентраций антибиотиков исходили из информации, предлагаемой PhytoTechnology Laboratories, USA (1). В качестве контроля использовали модифицированную среду WPM, без добавления биологически активных веществ (WPM, б/г). Материал культивировали в оптимальных условиях.

Чистоту растительного материала и оценку сформировавшихся микрорастений-регенерантов спустя 30 дней выполняли аналогично работе [5].

Результаты и их обсуждение.

Выполненные исследования показали, что тестируемый материал карельской березы характеризовался накоплением в тканях значительного количества бактериальной инфекции. Об этом свидетельствует наличие роста бактерий на поверхности и в глубине питательной среды в контроле.

При культивировании эксплантов на средах, дополненных гентамицином в концентрациях 100 или 300 мг/л, выявлено подавление процесса их регенерации. У микрорастений клонов 76 и 81 наблюдали хлороз, соответственно, в 100% и 10-30,0%. Выжившие экспланты характеризовались отсутствием роста побегов либо минимальным ростом. Имеющиеся листья у 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 однозначный негативный эффект апробированных концентраций гентамицина на морфогенный статус узловых сегментов побегов березы карельской.

При использовании в составе питательной среды стрептомицина в количестве 500 мг/л у клона 81 отмечали очень слабый рост 40% эксплантов, остальные экспланты не развились и некротизировали. Наблюдала появление в толще питательной среды слабо развитой бактериальной инфекции у оснований узловых сегментов побегов. Увеличение концентрации стрептомицина до 1000 мг/л в культуральной среде, подавляя рост бактерий, способствовало развитию хлороза и некроза у всех эксплантов.

При использовании цефотаксима, карбенициллина и их совместной комбинации не установлено негативное их воздействие на развитие эксплантов у клонов 76 и 81. Наблюдала достаточно активный рост побегов в высоту, формирование зеленых листьев, стабильное корнеобразование. В большей мере действие β -лактамов антибиотиков отмечали на показатель «высота побегов» и на 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. Наиболее оптимальным для регенерации эксплантов является использование β -лактамов антибиотиков для клона 76, в меньшей мере — для клона 81, и практически неэффективно для клона 2а.

При действии β -лактамов антибиотиков коэффициент мультипликации при условии применения в качестве эксплантов однопочечных сегментов побегов у клонов 76 и 81 оставался на уровне значения контрольного варианта, у клона 2а снижался с 3 до 2. Гентамицин в тестируемых концентрациях существенно влиял на снижение значения коэффициента мультипликации с 4-5 до 0 у клонов 76 и 81, и с 3 до 0 у клона 2а (Рисунок 1). Аналогичный негативный эффект гентамицина был определен ранее в культуре тканей березы повислой и березы пушистой [5].

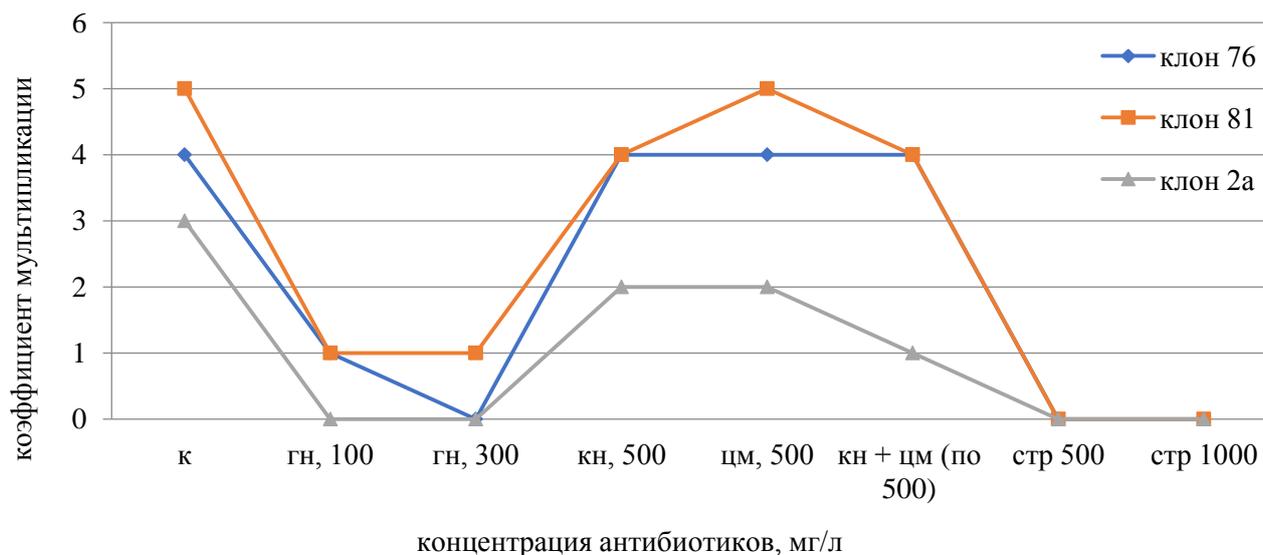


Рисунок 1. Влияние антибиотиков на коэффициент мультипликации

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

При последующем субкультивировании растительного материала на безгормональные среды была визуально оценена эффективность применения антибиотиков для избавления материала от бактериальной инфекции. В нашем эксперименте позитивные результаты показало применение карбенициллина либо его совместное действие с цефотаксимом. В дальнейшем появление бактериальной инфекции наблюдали спустя 6-9 пассажей. При внесении только цефотаксима в состав среды, инфекция появлялась через 1-3 пассажа. С большой вероятностью можно утверждать, что применение химических веществ, обладающих антибактериальным действием, при работе с культурой ткани растений является обязательным условием.

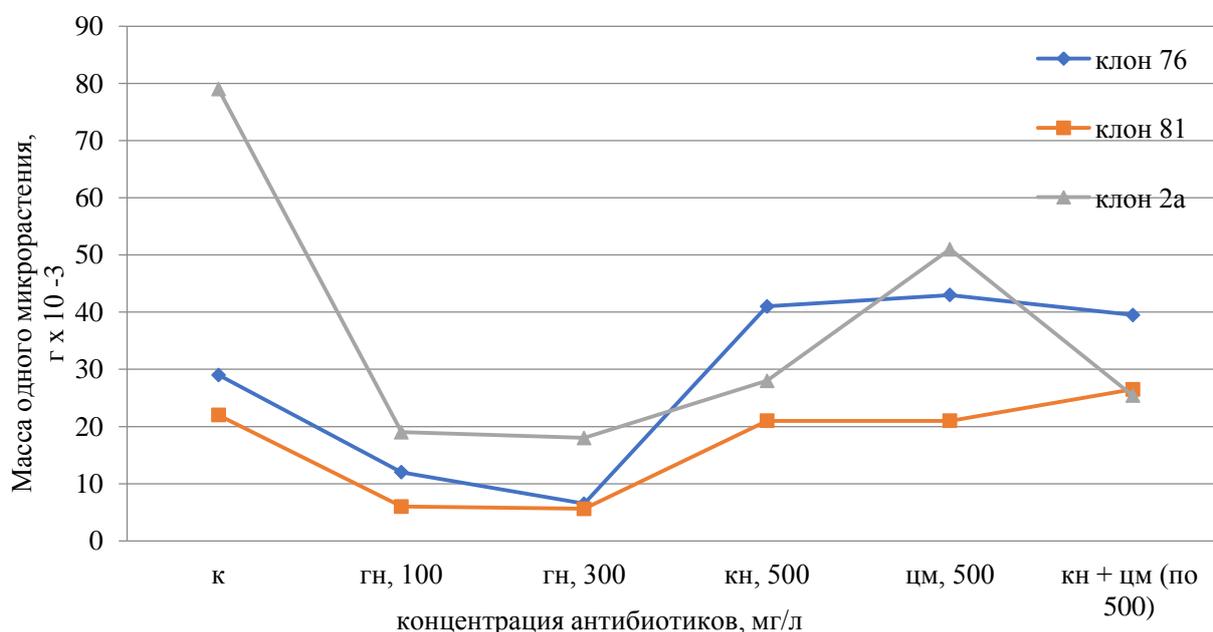


Рисунок 2. Влияние антибиотиков на массу одного регенеранта

Данные результаты сходны с материалом, представленном ранее Dodds J. H. с соавторами на культуре тканей растений [6]. Такой подход не только позволит расширить спектр действия антибиотиков на микроорганизмы, но и при соответствующем грамотном подборе комбинаций антибиотиков будет способствовать сохранению ростовых процессов растений в полном объеме, как это было выявлено для карельской березы в нашем опыте. Тем не менее, сохраняется риск увеличения соматоклональной изменчивости в результате применения антибиотиков. И следует учитывать их токсичность не только на микроорганизмы, но и растительные ткани.

Выводы

Таким образом, в ходе исследований было установлено:

1. Выявлено негативное воздействие присутствия в питательной среде гентамицина в концентрации 100 и 300 мг/л на культуру тканей тестируемых клонов карельской березы. Последующее субкультивирование эксплантов на свежие безгормональные среды

индуцирует их гибель либо, при сохранении жизнеспособности, существенно подавляет ростовые процессы.

2. На этапе мультипликации побегов карельской березы наиболее оптимальным является применение цефотаксима в сочетании с карбенициллином, в концентрациях по 500 мг/л. Указанные режимы позволяют поддерживать визуально чистую культуру тканей, без существенного негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений и их жизнеспособность.

3. При работе с культурой клеток и тканей растений для поддержания ее стерильности в течение длительного периода времени следует придерживаться концепции совместного использования нескольких видов антибиотиков, различающихся по механизму их воздействия на бактериальную клетку и с разным спектром действия на микроорганизмы, либо чередовать их применение. Не рекомендуется использовать антибиотики в каждом пассаже при рутинном размножении.

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

Источники:

(1). Antibiotics // PhytoTechnology Laboratories. Режим доступа: clck.ru/DH4ur (дата обращения: 19.02.2016).

Sources:

(1). Antibiotics // PhytoTechnology Laboratories. Access mode: clck.ru/DH4ur (date of circulation: 19.02.2016).

Список литературы:

1. Концевая И. И. Влияние цитокининов на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы // Проблемы лесоведения и лесоводства, 2008. №68. С. 205-213.

2. Живулькина Е. В. Береза карельская в Беларуси: ресурсы, структура и состояние насаждений // Ботаника: исследования. 2005. №. 33. С. 135-146.

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. Lloyd G. et al. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. 1980. Т. 30. С. 421-427.

5. Концевая И. И., Жадько С. В. Эффективность применения антибиотиков на этапе мультипликации при клонировании березы // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. 2016. №6. С. 24-30.

6. Dodds J. H., Roberts L. W. Experiments in plant tissue culture. Aseptic techniques // Cambridge: Cambridge Univ. Press. U.K. 1982. С. 24.

References:

1. Koncevaya, I. I. (2008). Effect of cytokinins on morphogenesis in the culture of birch leaf explants. *Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus*, (68), 205-213.

2. Zhivulkina, E. V. (2005). Karelian birch in Belarus: resources, structure and condition of plantings. *Botany: research*, (33), 135-146.

3. Dunaeva, S. Ye., & Osledkin, Yu. S. (2015). Bacterial microorganisms associated with plant tissues in culture in vitro: identification and possible role. *Agricultural Biology*, 5(1), 3-15
4. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture.*, 30, 421-427.
5. Kontsevaya, I. I., & Zhadko, S. V. (2016). Effektivnost primeneniya antibiotikov na eh tape mul'tiplikacii pri klonirovanii breezy. *Izvestiya Gomelskogo gosudarstvennogo universiteta imeni F. Skoriny*, (6), 24-30.
6. Dodds J. H., & Roberts L. W. (1982). Experiments in plant tissue culture. Aseptic techniques. Cambridge: Cambridge Univ. Press. U.K. 24.

Работа поступила
в редакцию 22.04.2018 г.

Принята к публикации
27.04.2018 г.

Ссылка для цитирования:

Концевая И. И. Применение антибиотиков для оптимизации микроразмножения *Betula pendula* var. *carelica* Merckl. // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. №5. С. 68-73. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/kontsevaya-i> (дата обращения 15.05.2018).

Cite as (APA):

Kontsevaya, I. (2018). Use of antibiotics to optimize micropropagation of *Betula pendula* var. *carelica* Merckl. *Bulletin of Science and Practice*, 4(5), 68-73.