

УДК 634.8. 037: 581.143 6

UDC 634.8. 037: 6 581.143

АНТИБИОТИКИ ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА

ANTIBIOTICS FOR CLONAL GRAPES MICRO PROPAGATION

Дорошенко Наталья Петровна
д-р с.-х. наук, доцент,
зав. лабораторией биотехнологии

Doroshenko Natalya
Dr. Sci. Agr., Docent
Head of the Laboratory of Biotechnology

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потанина, Новочеркасск, Россия

Federal State Budgetary Scientific Organization The All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya. I. Potanin, Novocherkassk, Russia

В статье приведены литературные данные о контаминации микоплазмами клеточных культур и растений при клональном микро размножении. Представлена вредоносность контаминации и её источники. Показана необходимость проведения антибактериальной химиотерапии, основанной на свойстве антибиотиков подавлять развитие патогенной микрофлоры. При выборе антибиотика необходимым условием является отсутствие токсического действия. В связи с этим была поставлена цель разработать способы деконтаминации и улучшения качественных характеристик растений. Для проведения исследований отобраны два антибиотика: гентамицин и цефотаксим. Изучение действия антибиотика гентамицин осуществлено при микро размножении 14 сортов винограда. Установлено, что гентамицин способствует оздоровлению от микозов, улучшению в 2-3 раза регенерации растений. Однако при этом растения проявляют признаки бактериального заражения и токсического действия антибиотика. Для уменьшения токсичности рекомендуется двухступенчатый способ внесения его в питательную среду. При первом субкультивировании в питательную среду добавляется гентамицин в концентрациях 0,05-0,3 мл/л, что обеспечивает значительное оздоровление от микоплазм. При втором субкультивировании для полного оздоровления растений

The article presents the literature data on contamination of cell cultures and plants by Mycoplasma during clonal micro propagation. The severity of contamination and its sources are presented. The necessity of antibacterial chemotherapy based on the ability of antibiotics to inhibit the growth of pathogenic organisms is shown. When choosing antibiotic the necessary condition was the absence of toxic action. In this regard, the object was to develop the methods of decontamination and improvement of qualitative characteristics of plants. Two antibiotics were selected for research: gentamicin and Cefotaxime. The study of the antibiotic gentamicin was carried out during micro propagation of 14 grapes varieties. It was found out that gentamicin promotes the recovery from fungal infections and improves a plant regeneration in 2-3 times. However, the plants show the signs of bacterial infection and the toxic effect of the antibiotic. To reduce the toxicity two-step way of its application into nutrient medium recommended. During the first subcultivation in a nutrient medium gentamicin is added in concentrations of 0.05-0.3 ml/l. It provides a significant recovery from Mycoplasma. In the second subcultivation for full plant recovery we recommend re-use of gentamicin at low concentrations

рекомендуется повторное применение гентамицина в пониженных концентрациях – 0,01-0,04 мг/л. Цефотаксим в концентрациях 50-650 мг/л изучен на 5 сортах винограда. Установлено, что под действием антибиотика снижается заражение бактериальной инфекцией. Отмечено более мягкое действие цефотаксима, чем гентамицина. При его применении происходит улучшение морфогенеза культивируемых растений. При слабом инфицировании растений эффективны низкие концентрации цефотаксима – 50-250 мг/л. При заражении до 50 % растений эффективны концентрации 250-450 мг/л. Разработаны способы деконтаминации растений, основанные на применении антибиотика гентамицин в концентрации 0,1-0,01 мг/л или антибиотика цефотаксим в концентрации от 50 до 450 мг/л в зависимости от степени инфицирования пробирочных растений.

Ключевые слова: КОНТАМИНАЦИЯ, ХЕМОТЕРАПИЯ, ГЕНТАМИЦИН, ЦЕФОТАКСИМ, ТОКСИЧНОСТЬ, КОНЦЕНТРАЦИЯ, СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

of 0.01-0.04 ml/L. Cefotaxime in concentrations of 50 to 650 mg/l was studied on 5 varieties of grapes. It was established that the antibiotic decreases the contamination by a bacterial infection. It was noted that the action of Cefotaxime is gentler than the action of gentamicin. Its application improves the morphogenesis of cultivated plants. In low infection of plants, the low concentrations of Cefotaxime are effective – 50-250 mg/L. When the infection is to 50 % of plants the concentration of 250-450 mg/L are effective. Methods of decontamination of plants are developed. They are based on the application of the antibiotic gentamicin at a concentration of 0.1-0.01 ml/l or antibiotic Cefotaxime at a concentration of 50 to 450 mg/l depending on the degree of infection in vitro plants.

Key words: CONTAMINATION, CHEMOTHERAPY, GENTAMICIN, CEFOTAXIME, TOXICITY, CONCENTRATION, METHOD OF APPLICATION

Введение. При клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций.

Наиболее распространенную контаминацию клеточных культур составляют микроорганизмы класса *Mollicutes*, главным образом микоплазмы и ахелоплазмы. По данным американских авторов, 60-90% перевиваемых линий клеток контаминированы микоплазмами. В первичных клеточных культурах микоплазмы наблюдаются значительно реже [1].

Когда контаминацию игнорируют, она не исчезает сама собой, но и распространяется на другие, не инфицированные культуры. Инфекция иногда переходит в острую форму, и тогда до 25% общего белка в культуре клеток и до 15% ДНК может быть микоплазменного происхождения.

В связи с этим микоплазмы существенно влияют на метаболизм клетки хозяина, вызывая изменения аминокислотного, углеводного и нуклеинового обмена [2].

Инфицированные бактериями культуры достаточно хорошо определяются макроскопически и могут быть легко выбракованы, так как вызывают помутнение культуральной среды. Тем не менее, описаны случаи инфицирования клеток некоторыми видами бактерий, которые не вызывают ни помутнения культуральной среды, ни ярко выраженных цитодеструктивных изменений клеточного монослоя. Среди них были выявлены коринбактерии, микрококки и бациллы [3].

Определить источник контаминации в большинстве случаев бывает чрезвычайно трудно. Известно, что иногда контаминация является прямым следствием использования инфицированного экспланта. Кроме того, источником контаминации могут явиться компоненты питательных сред. Реальным и достаточно распространенным источником контаминации является внутрилабораторная передача инфекции из воздуха, от персонала, от используемых лабораторных препаратов и от одной культуры клеток к другим. Известно, что совместное культивирование в одном помещении контаминированных и свободных от микоплазм клеток уже через 1-2 пассажа приводит к инфицированию последних.

Бургутин А.Б. и др. при введении в культуру изолированных почек черешни и вишни отбирали клоны растений без визуальных признаков микробиологического «загрязнения» [4]. Первые три субкультивирования у полученных побегов не наблюдали контаминации. При дальнейшем культивировании для некоторых клонов наблюдали беловатую, либо желтоватую слизь в основании побегов на поверхности среды; в дальнейшем эта контаминация распространялась и в толще среды. Постепенно все клоны оказались контаминированы и погибли; остались клоны, переведенные в почвенную культуру.

Авторами из культуральной среды были выделены и изучены несколько морфологических типов бактерий, проведена их идентификация методом секвенирования фрагмента гена 16SrRNA. Выделенные бактерии представляли собой смесь различных видов и демонстрировали непостоянство биохимических и морфологических свойств.

По предварительным данным проведенного анализа, источниками заражения растений *in vitro* являются ризосферная, эпифитная и эндофитная микрофлора растений и болезнетворная микрофлора человека.

Причинами повреждающего действия микоплазм считаются конкуренция за компоненты питательной среды. Разные микоплазмы с разной степенью интенсивности потребляют глюкозу, аргинин, нуклеотиды и нуклеозиды, витамины и другие компоненты питательной среды. Даже простое обеднение среды этими веществами должно влиять на метаболизм и функции культивируемых клеток, но в результате утилизации глюкозы или аргинина микоплазмами происходит еще и закисление или защелачивание среды, что приводит, как минимум, к угнетению роста культивируемых клеток.

Микоплазмы в клеточной культуре – не просто досадная помеха, а фактор, ведущий к ложной интерпретации результатов и возможной потере культуры. Микоплазмы способны изменять различные свойства культивируемых клеток. Природа воздействия микоплазм зависит от вида и штамма микоплазм, а также от типа инфицированных клеток. Особенности биологической и биохимической активности микоплазм разных видов определяют специфику их воздействия на инфицированные клетки, в том числе степень цитопатических эффектов (ЦПЭ).

Например, многие виды рода *Mycoplasma* вызывают ЦПЭ, тогда как другие не оказывают значительных воздействий подобного рода (поэтому такие контаминации в принципе не обнаруживаются длительное время). Для цитопатогенного действия микоплазм характерен очень широкий диа-

пазон: от практически незаметных морфологических изменений клеток до явных картин конденсации хроматина, изменений морфологии хромосом, агрегации ядрышек и других проявлений апоптоза, вплоть до разрушения или полного лизиса клеток.

Для деконтаминации проводят антибактериальную химиотерапию, основанную на применении антибиотиков. Стремление использовать антагонизм микроорганизмов против фитопатогенной микрофлоры возникло задолго до открытия антибиотиков. Еще в 20-х годах изучали возможность использования бактерий-антагонистов против возбудителей заболеваний растений. Многочисленные экспериментальные исследования показали, что большинство используемых антибиотиков хорошо проникают в ткани растений через корни, стебли, листовую поверхность, впитываются в семена и т.д. Скорость проникновения в растение определяется свойствами антибиотика. Особенно быстро проникают в ткани растений антибиотики нейтральной и кислой природы (хлорамфеникол, пенициллин), медленнее – амфотерные антибиотики (хлортетрациклин, окситетрациклин) и антибиотики-основания (неомицин, стрептомицин).

Быстрое проникновение антибиотиков в растение и распространение в его тканях при сравнительно медленном темпе инактивации позволяют создавать определенное насыщение антибиотиком, необходимое для подавления фитопатогенной микрофлоры.

При выборе антибиотика необходимым условием является отсутствие токсичности. Некоторые антибиотики, такие как мицетин, клавацин, субтилилин, глиотоксин, токсичны для растений даже в сравнительно малых дозах: субтилилин угнетает прорастание семян пшеницы и гороха в разведении 1: 100 000, клавацин подавляет рост корней злаков в разведении 1: 1 000 000. В лабораторных условиях возможны случаи хронического отравления растений даже слаботоксичными антибиотиками, которые применялись длительно и бессистемно. Проявления токсического действия ан-

антибиотиков очень разнообразны: задержка роста и развития растения, угнетение роста корней или надземных частей растения, нарушение процесса образования хлорофилла и др.

Использование антибиотиков основано на их свойстве подавлять развитие патогенной микрофлоры. Кроме того, антибиотики, как и другие микробные метаболиты, могут оказывать непосредственное воздействие на обмен веществ и развитие растений. Антибиотики могут оказывать и стимулирующее влияние на рост и развитие растений, определенным образом активировать отдельные процессы и функции. Чаще всего это действие выражается в ускорении роста растений и повышении прироста зеленой массы в отдельных случаях на 15-50%.

Для деконтаминации используют антимикоплазменные антибиотики, но применение их для повседневного культивирования приводит к появлению устойчивых штаммов микоплазм. Так, тилозин, линкомицин, кантамицин и гентамицин в настоящее время уже не способны полностью освободить клетки от микоплазм [5]. Увеличение дозы этих антибиотиков способствует снижению степени контаминации, но при этом происходит угнетение морфогенеза растений.

Цель исследования – разработка способов деконтаминации для повышения приживаемости и регенерации оздоровленных от микоплазм растений, улучшение морфогенеза и качественных характеристик оздоровленных растений, повышение эффективности клонального микроразмножения растений винограда в культуре *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Изучали антибиотик гентамицин, относящийся к группе аминогликозидов широкого спектра действия. Гентамицин быстро проникает сквозь клеточную мембрану микроорганизмов, успешно соединяется с субъединицей рибосом клеток микроорганизмов, что блокирует синтез белка, препятствуя образованию комплекса

транспортной и информационной РНК, при этом происходит ошибочное считывание РНК и образование нефункциональных белков. Обладает бактерицидным действием – в больших концентрациях снижает барьерные функции цитоплазматических мембран и вызывает гибель микроорганизмов. Оказывает антисептическое влияние по отношению к большинству грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе на мутированных микробов, приспособившихся к другим антибиотикам.

Цефотаксим является полусинтетическим аналогом цефалоспорины – антибиотика третьего поколения. Цефалоспорины выделяются грибами рода *Cephalosporum*, основной продуцент этого антибиотика – гриб вида *C. acremonium*. По химическому строению антибиотик принадлежит к группе лактамных соединений, близких к пенициллинам. Биологическая активность цефотаксима связана с образованием при его разложении стимуляторов роста и морфогенеза. Кроме этого, цефотаксим широко применяется для элиминации *Agrobacterium tumefaciens* в опытах по генетической трансформации.

Характер стимуляции морфогенеза под действием цефотаксима, как предполагают С. А. Данилова, Ю. И. Долгих, является видоспецифичным [6]. Показано положительное влияние на рост культивируемых тканей и морфогенез у яблони [7] хлопчатника [8], у злаковых растений [9], у твердой пшеницы число регенерированных растений увеличивалось под действием антибиотика в 17 раз [10]. Аналогичные результаты были получены и при применении антибиотика в культуре тканей сорго [11] и кукурузы. Таким образом, цефотаксим стимулирует морфогенетический процесс и увеличивает частоту регенерации растений, что сокращает период культивирования тканей *in vitro*.

Так как в научной литературе не обнаружено данных о влиянии цефотаксима на культивируемые *in vitro* меристемы и регенерированные из них растения винограда, исследовано действие антибиотика на процесс морфогенеза винограда в культуре *in vitro*.

Исследования проводились по общепринятым в биотехнологии методикам (Уайт, 1949; Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986; Дорошенко, 1992) усовершенствованным в лаборатории биотехнологии ГНУ ВНИИ-ВиВ им Я.И. Потапенко.

Обсуждение результатов. Изучение действия антибиотика гентамицина начали на этапе микрочеренкования на сорте винограда Феркаль. Антибиотик добавляли в твердую питательную среду после её автоклавирования и затем в боксе разливали в стерильные пробирки. В течение 127 дней осуществляли наблюдения за состоянием растений.

Результаты исследований эффективности гентамицина в концентрациях 0,1; 0,3 и 0,5 мл/л приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Изучение действия различных концентраций антибиотика гентамицин в составе питательной среды, сорт Феркаль, 2008 г.

Вариант (конц-центр., мл/л)	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Коэф. полярности	Листьев, шт.	Скорость, мм/сут.
		число, шт.	длина, см	ризог. зона, см				
45 дней культивирования								
Контроль	40,5	1,5	0,77	0,19	0,2	0,95	–	0,04
ГМ-0,1	95,0	2,0	0,75	0,15	0,2	0,71	–	0,04
ГМ-0,3	95,0	0,2	0,2	0,04	1,2	0,03	–	0,02
ГМ-0,5	97,6	0,1	0,5	0,05	0,07	0,94	–	0,02
60 дней культивирования								
Контроль	30,9	2,0	4,9	9,8	4,5	2,2	1,0	0,075
ГМ-0,1	83,0	3,2	0,9	2,9	1,7	1,7	1,9	0,03
ГМ-0,3	73,8	0,3	0,2	0,06	0,2	0,3	0,3	0,04
ГМ-0,5	76,2	0,4	0,7	0,3	0,05	6,0	0,1	0,02
85 дней культивирования								
Контроль	28,6	3,5	3,1	10,7	5,4	2,0	3,0	0,06
ГМ-0,1	76,2	4,7	1,2	5,6	3,3	1,7	3,4	0,04
ГМ-0,3	73,8	0,5	0,8	0,4	0,6	0,7	0,9	0,007
ГМ-0,5	50,0	1,0	0,9	0,8	0,1	5,8	0,4	0,002

Следует отметить, что гентамицин способствовал улучшению приживаемости микрочеренков и регенерации растений. Приживаемость и со-

хранение растений при введении его в состав питательной среды превышали эти показатели растений в контрольном варианте в 2-3 раза.

Скорость роста растений при применении гентамицина снижалась, и ухудшались их ростовые характеристики. Эти отрицательные явления наиболее существенно проявились при концентрациях 0,3-0,5 мл/л. При концентрации 0,1 мл/л, несмотря на замедление роста, происходило удовлетворительное развитие как ризогенной зоны, так и побегов, растения имели здоровый вид.

При концентрациях 0,05; 0,1; 0,2 и 0,3 мл/л также подтвердилось положительное влияние гентамицина на оздоровление от микозов, что способствовало повышению приживаемости микрочеренков и развитию их в растения (рис.).

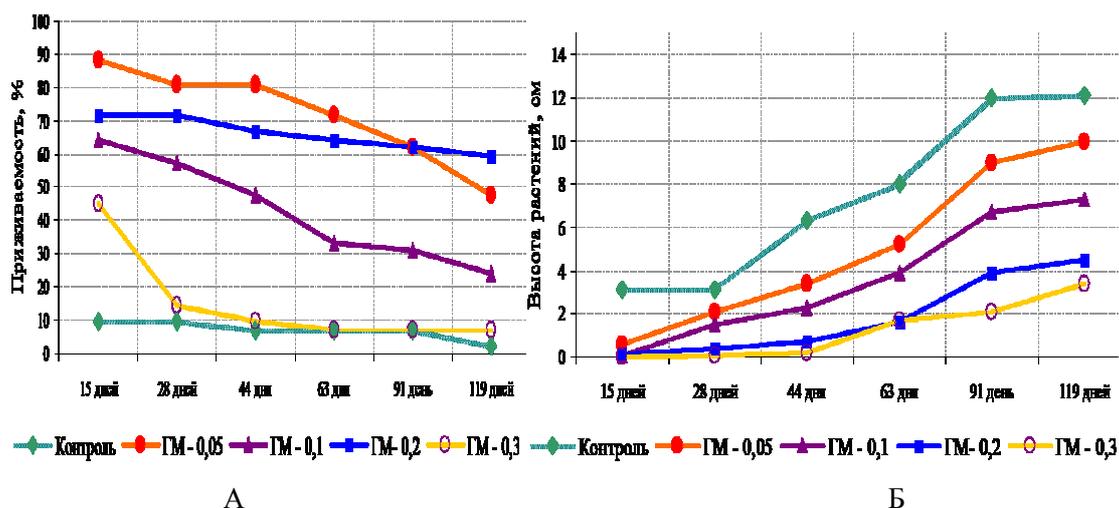


Рис. 1. Влияние различных концентраций гентамицина на регенерацию (А) и рост (Б) растений сорта Феркаль

Через 44 дня культивирования приживаемость в контрольном варианте составила 7,1%, а при введении в состав питательной среды гентамицина (0,05 мл/л) – 81,0%, то есть улучшилась в 11,5 раз.

Значительное улучшение приживаемости отмечено и при концентрациях антибиотика 0,2 и 0,3 мл/л. Проявилось токсическое влияние антибиотика на образование и рост корней, рост побегов, образование и рост листьев. Менее всего пострадали от гентамицина растения при минималь-

ной концентрации – 0,05 мл/л. При культивировании они отличались по размерным характеристикам от контрольных растений, но имели более здоровый, жизнеспособный вид.

Сравнительное изучение концентраций гентамицина в составе питательной среды при культивировании подвойных сортов винограда показало улучшение приживаемости растений при концентрации гентамицина 0,1 мл/л и улучшение морфогенеза при концентрации 0,05 мл/л. Аналогичное состояние растений отмечено у аборигенных сортов винограда Красностоп золотовский и Кумшацкий белый.

Исследовано действие концентраций гентамицина – 0,01;0,05 и 0,1 мл/л на сорте Фиолетовый ранний (табл. 2).

Таблица 2 – Изучение действия антибиотика гентамицин в составе питательной среды на этапе микрочеренкования, Фиолетовый ранний, 2008-2009 гг.

Вариант (кон-центр., мл/л)	Прижи-ваемость, %	Корни			Высота растен., см	Число листь-ев, шт.	Ско-рость, см/сутк.
		число, шт.	длина, см	ризоген. зона, см			
35 дней культивирования							
Контроль	26,2	5,2	1,9	9,9	3,1	3,4	0,09
ГМ-0,01	73,8	5,8	1,9	11,0	2,9	3,1	0,08
ГМ-0,05	78,6	6,6	0,9	5,8	2,9	3,9	0,08
ГМ -0,1	78,6	0,3	0,6	1,8	2,0	2,0	0,02
71 день культивирования							
Контроль	21,4	8,2	2,2	18,0	7,5	8,0	0,1
ГМ-0,01	73,8	7,2	3,4	24,4	8,1	8,1	0,1
ГМ-0,05	72,6	7,8	0,9	7,0	6,6	7,1	0,09
ГМ-0,1	38,1	3,7	1,0	3,7	1,6	3,2	0,02

Выявлено, что при введении гентамицина в состав питательной среды приживаемость (регенерация) растений увеличилась через 35 дней культивирования с 26,2 % в контроле до 73,8- 78,6% в вариантах с антибиотиком, то есть в 2,8-3,0 раза. При концентрациях 0,05-0,1 мл/л наблюдалось уменьшение корнеобразования, высоты растений и их облиствен-

ности, особенно значительное при содержании гентамицина в питательной среде – 0,1 мл/л. При концентрации 0,01 мл/л наблюдалось увеличение ризогенной зоны и некоторое улучшение ростовых процессов.

Растения сортов Цимлянский белый, Кобер 5ББ, Гравесак, Презент, Феркаль, клон Цимлянского черного (2-3) культивировали в течение 60 дней на питательной среде с содержанием гентамицина 0,05 мл/л. Растения не имели внешних признаков бактериального заражения.

Для того чтобы проверить действительно ли они оздоровлены от микозов, растения были расчеренкованы и высажены на питательную среду Мурасиге и Скуга без содержания антибиотика. Одного субкультивирования на среде с гентамицином оказалось недостаточно, и растения проявили признаки бактериального заражения. В связи с этим, проведено сравнительное изучение повторного применения антибиотика гентамицин в пониженных концентрациях (табл. 3) на сорте Талисман.

Таблица 3 – Развитие растений сорта Талисман при повторном применении гентамицина в пониженных концентрациях, 2009 г.

Вариант (кон- центр., мл/л)	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.	Рост, см/сутки
		число, шт.	длина, см	ризоген. зона, см			
42 дня культивирования							
ГМ-0,01	97,6	8,3	1,3	10,8	5,5	6,0	0,13
ГМ-0,02	97,6	6,1	0,8	4,9	4,3	3,8	0,10
ГМ-0,03	95,2	7,2	0,6	4,3	2,8	3,1	0,06
ГМ-0,04	97,6	5,4	0,6	3,2	2,0	2,7	0,04
62 дня культивирования							
ГМ-0,01	97,6	9,3	1,3	12,6	9,2	8,4	0,14
ГМ-0,02	97,6	6,9	1,0	6,9	6,6	5,6	0,09
ГМ-0,03	95,2	7,0	0,5	3,5	3,8	4,0	0,06
ГМ-0,04	97,6	5,4	0,8	4,3	3,3	3,6	0,05
82 дня культивирования							
ГМ-0,01	97,6	9,7	1,4	13,6	12,0	10,7	0,14
ГМ-0,02	92,8	8,5	1,8	15,3	8,3	7,9	0,10
ГМ-0,03	95,2	7,5	0,6	4,5	4,5	5,6	0,05
ГМ-0,04	97,6	5,8	0,8	4,6	4,2	5,2	0,05

При повторном применении антибиотика отмечена высокая приживаемость растений во всех вариантах опыта, что указывает на незначительное заражение микозами однократно оздоровленных гентамицином растений. Положительным является тот факт, что при минимальной концентрации антибиотика в сравнении со всеми другими наблюдалось существенное улучшение корнеобразования, высоты и облиственности растений, скорости их роста, то есть отсутствовала интоксикация. На основании этого можно предположить, что гентамицин в минимальных концентрациях при повторном применении не оказывает токсического воздействия на растения, культивируемые *in vitro*.

Исследована возможность повторного применения пониженных концентраций гентамицина на сортах Памяти Кострикина, Кабашный, Красностоп золотовский, Кумшацкий. Выявлено, что даже при высокой инфицированности микозами растений сорта Памяти Кострикина, гентамицин в концентрации 0,03 мл/л способствует более высокой приживаемости микрочеренков. Ростовые процессы при этой концентрации также были более интенсивными, чем при концентрации 0,05 мл/л.

При двукратном внесении антибиотика гентамицин отмечен положительный результат по приживаемости и ростовым процессам у растений сорта Талисман (0,01 мл/л); у сорта Памяти Кострикина: по приживаемости – при концентрации 0,03 мл/л и развитию растений – при 0,01 мл/л; у сорта Кумшацкий: по приживаемости (0,01 и 0,03 мл/л) и достаточно высоким показателям развития растений – при концентрации 0,01 мл/л.

Улучшение корнеобразования и показателей роста побегов на уровне контроля обнаружены у растений сорта Кабашный при концентрации 0,01 мл/л. Растения были выровненными, хорошо выглядели, имели крепкие прямостоячие стебли и листья ярко-зеленой окраски. На адаптацию было передано 92,0% растений сорта Кабашный; 80,9%, сорта Красностоп золотовский; 94,0% растений сорта Кумшацкий. Это высокий результат культивирования.

Улучшение качественных показателей растений после двукратного применения антибиотика можно объяснить деконтаминацией растений от микозов, что и было целью настоящего исследования.

Цефотаксим изучен на сортах Красностоп золотовский, Крестовский, Пино нуар, Баклановский и на сорте Памяти Кострикина в концентрациях 50, 150, 250, 350, 450, 550, 650 мг/л. Добавление его в состав питательной среды способствовало повышению регенерационной способности растений сорта Красностоп золотовский (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние антибиотика цефотаксим на ростовые процессы сорта Красностоп золотовский, 2009 г.

Вариант (концентр., мл/л)	Прижи- ваемость, %	Корни			Высота расте- ний, см	Число листьев, шт.	Ско- рость, см/сут.
		число, шт.	дли- на, см	ризоген. зона, см			
Учет через 37 дней культивирования							
Контроль	85,7	5,9	3,2	18,9	5,7	4,2	0,15
Цф - 200	90,4	4,6	3,6	16,6	6,4	5,2	0,17
Цф - 400	71,4	4,6	3,3	15,1	6,3	5,3	0,17
Цф - 600	73,8	3,6	3,6	13,0	6,2	5,0	0,16
Учет через 65 дней культивирования							
Контроль	52,3	5,6	4,1	23,0	14,3	10,3	0,22
Цф - 200	76,1	5,2	4,4	22,9	14,3	10,1	0,22
Цф - 400	61,9	5,2	4,4	22,9	15,5	10,5	0,24
Цф - 600	71,4	4,7	4,3	20,2	13,7	10,1	0,21

При культивировании выделился вариант с концентрацией 200 мг/л, в котором отмечена самая высокая приживаемость растений (90,4 %) и увеличение скорости роста, высоты и облиственности растений. Хорошие показатели ростовых процессов надземной части растений зафиксированы и при концентрациях цефотаксима 400 и 600 мг/л.

У некоторых растений сорта Крестовский, регенерированных из апикальных меристем, отмечалась шиповатость листьев, что может свидетельствовать о недостаточном оздоровлении их. Поэтому в питательную среду при первом субкультивировании вводили антибиотик цефотаксим.

Выявлено, что цефотаксим в концентрациях 250-450 мг/л повышает приживаемость микрочеренков растений с шиповатыми листьями в 6,0-6,5 раз, а у растений с нормальными листьями – в 1,5-1,8 раз. Положительного влияния на ростовые процессы размножаемых растений не было выявлено.

При повторном субкультивировании растений сорта Крестовский цефотаксим в концентрации 250 мг/л положительно повлиял на регенерацию микрочеренков, которая в сравнении с контролем увеличилась на 14,2 – 17,2%, а также на рост побегов, их облиственность, скорость роста побегов. При повторном субкультивировании не обнаружено растений с шиповатыми листьями.

На сорте Памяти Кострикина изучено 7 концентраций антибиотика: 50, 150, 250, 350, 450, 550 и 650 мг/л. Во всех вариантах под действием цефотаксима улучшилась в 1,6-2,6 раза регенерация растений. Более высокая регенерационная способность микрочеренков отмечена при концентрации 50 мг/л – 85,7 % и 250 мг/л – 71,4 мг/л, в сравнении с контролем – 32,1 %. В результате добавления его в питательную среду улучшились во всех вариантах ростовые процессы. Возросло, по сравнению с контрольным вариантом, число корней, их длина и общая длина ризогенной зоны, а также высота растений и число листьев, скорость роста растений.

Наиболее высокими эти показатели были при максимальных концентрациях – 550 и 650 мг/л. По регенерационной способности растений и по развитию побегов выделился вариант с концентрацией цефотаксима 50 мг/л. Хорошие результаты получены при концентрации 250 и 650 мг/л.

Также изучение проводилось на растениях, инфицированных в сильной степени (табл. 5).

Таблица 5 – Применение антибиотика цефотаксим на инфицированных в сильной степени растениях сорта Памяти Кострикина, 2010 г.

Вариант (кон-центр., мг/л)	При-жив., %	Корни			Вы-сота, см	Число листьев, шт.	Скор., см/сутки	Ко-эфф. полярности
		чис-ло, шт.	длина, см	ризо-генная зона				
Контроль	11,9	2,3	2,4	5,5	2,7	2,5	0,09	2,0
ЦФ 50	69,0	3,3	2,6	8,6	3,5	3,3	0,11	2,4
ЦФ 150	52,3	2,6	2,5	6,5	2,9	2,6	0,09	2,2
ЦФ 250	53,8	3,4	2,2	7,4	3,4	2,8	0,11	2,2
ЦФ 350	71,4	3,8	2,1	8,0	2,9	2,3	0,09	2,8
ЦФ450	76,2	4,2	1,8	7,6	2,7	2,6	0,09	2,8
ЦФ 550	59,5	3,0	1,9	5,7	1,8	1,9	0,06	3,1
ЦФ 650	48,7	3,4	1,6	5,4	1,4	1,6	0,04	3,8
Учет через 40 дней культивирования								
Контроль	9,5	3,5	4,4	15,4	4,7	4,5	0,11	3,3
ЦФ 50	49,7	3,3	3,4	11,2	5,8	5,3	0,14	1,9
ЦФ 150	54,7	2,6	3,4	8,8	5,3	5,0	0,13	1,7
ЦФ 250	52,4	3,6	2,6	9,4	5,9	4,9	0,14	1,6
ЦФ 350	71,8	3,8	3,2	12,1	5,5	4,6	0,13	2,2
ЦФ450	73,8	5,0	2,5	12,5	5,2	5,1	0,13	2,4
ЦФ 550	52,3	3,7	2,9	10,7	4,4	4,8	0,10	2,4
ЦФ 650	38,4	4,5	2,1	9,4	4,4	4,5	0,11	2,1

На этом фоне также проявилось положительное влияние цефотаксима на приживаемость микрочеренков, увеличение у растений числа корней, длины ризогенной зоны, увеличение роста растений и их облиственности, а также, что немаловажно, улучшение скорости роста растений. В контроле, без применения цефотаксима, наблюдалась высокая гибель и низкая приживаемость микрочеренков.

Следует отметить, что в данном случае лучшие показатели по регенерации отмечены при повышенных концентрациях цефотаксима – 350 и 450 мг/л (выше, чем в контроле в 6,0-6,4 раза).

Достаточно высокая сохранность виноградных растений отмечена в течение всего периода культивирования при минимальной концентрации антибиотика (выше контроля в 5,6 раза).

По всем качественным признакам растений, при учете через месяц культивирования, бесспорным лидером являлась минимальная концентрация – 50 мг/л. Несколько хуже состояние растений было при концентрации 250 мг/л. Удовлетворительные результаты получены при содержании цефотаксима 350-450 мг/л. При концентрациях антибиотика 550 и 650 мг/л наблюдалось торможение ростовых процессов.

Анализ полученных данных показывает, что под действием антибиотика цефотаксим снижается заражение растений бактериальной инфекцией, что выражается в улучшении приживаемости микрочеренков и регенерации из них растений.

При слабом инфицировании растений применение антибиотика улучшает регенерацию на 5,0-15,0 % по сравнению с контролем (Красно-стоп золотовский, Крестовский). В данном случае эффективны низкие концентрации цефотаксима 50-250 мг/л. При заражении от 15 до 50 % растений (Крестовский, Памяти Кострикина) эффективность применения цефотаксима возрастает: приживаемость микрочеренков увеличивается по сравнению с контролем на 35-45 %. При этом эффективны концентрации 250-450 мг/л.

При сильной степени инфицирования (выше 50 %) наиболее четко проявляется деконтаминация растений винограда при всех концентрациях антибиотика. Лучшие результаты оздоровления получены при концентрациях цефотаксима 350-450 мг/л.

Следует отметить, что действие цефотаксима более мягкое, чем действие гентамицина. В зависимости от сортовых особенностей, степени инфицирования растений, применяемых концентраций отмечено увеличение скорости роста, числа корней и длины ризогенной зоны, высоты растений

и облиственности. Ингибирование показателей морфогенеза зафиксировано под влиянием повышенных концентраций антибиотика (450-650 мг/л), наиболее существенное – при 550-650 мг/л. В этих вариантах отсутствовало развитие 19,0 и 26,2 % микрочеренков.

Заключение. На основании проведенных исследований разработаны способы деконтаминации растений от микоплазменной инфекции при микроразмножении, основанные на добавлении в питательную среду антибиотика гентамицин в концентрации 0,1-0,01 мг/л или антибиотика цефотаксим в концентрации от 50 до 450 мг/л в зависимости от степени инфицирования пробирочных растений.

Литература

1. Миллер, Г.Г. Контаменанты клеточных культур / Г.Г. Миллер, И.В. Раковская, В.В. Неустроева, Н.В. Шалунова, Т.Д. [и др.] // Методы культивирования клеток.– Л.: Наука, 1987.– С. 104-126.
2. McGarrity G.J., Vanaman V., Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures a review // *In vitro*, 1984, Vol.20- pp. 1-18.
3. McGarrity G.J., Coriell L.L. Procedures to reduce contamination of cell cultures.// *In vitro*, 1971, Vol. 6. – pp-.257-265.
4. Баргутин, А.Б. Определение видовой принадлежности бактерий контаминирующих культуру древесных растений *in vitro* / А.Б. Баргутин, Н.В. Феоктистов, Н.В. Пунина [и др.] // Тезисы IX Международной конференции: Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. – Звенигород, 2008. – С. 60.
5. Falkiner F. R. Antibiotics and Antibiotic Resistance Associated Witch Plants, Fruits and Vegetables.// *Proc. Int. Symp. on Merth. and Marks. for Qual. Assur. in Micropropagation* Eds. A. C. Cassels, B. M. Doyle, R. F. Curry. *Acta Hort.* 2000.V. 530. P. 83-91.
6. Данилова, С.А. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима / С.А. Данилова, Ю.И. Долгих // *Физиология растений.*– 2004.– Т.51.– №4.– С. 621-623.
7. Yepes L.M. Aldwinckle H.S. Factors that Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple.and Effect of Antibiotics in Morphogenesis//*Plant Cell Tissye Organ Cult.*1994.V.37.P.257-269.
8. Agrawal D.C., Banerjee A.K., Kedari P.Y., Jcob S., Hazra S., Krishnamurthy R.V. Effect of Cefotaxime on the Growth of Excised Embryo-Axes of 6 Cultiwars of Cotton(*Gossypiumhirsutum L.*)//*J/Plant Physiol.*1998.V.152.P.580-582.

9. Mathias R.I., Mukasa C. The effect of Cefotaxime on the Growth and Regeneration of Callus from Four Varieties of Barley (*Hordeum vulgare*)//Plant Cell Rep.1987.P.454-457.

10. Borrelli G.M., Difonza N., Luppoto E. Effect of Cefotaxime on Callus Culture and Plant Regeneration in Durum Wheat // J/Plant Physiol. 1992. V.140. P.372-374.

11. Rao A.M., Sree K.P., Kishor P.B. K. Enhanced Plant Regeneration and in Grain and Sweet Sorghum by Asparagine, Proline and Cefotaxime // Plant Cell Rep. 1995. V.15. P. 72-75.

References

1. Miller, G.G. Kontamenanty kletocnyh kul'tur / G.G. Miller, I.V. Rakovskaja, V.V. Neustroeva, N.V. Shalunova, T.D. [i dr.] // Metody kul'tivirovanija kletok.– L.: Nauka, 1987.– S. 104-126.

2. McGarrity G.J., Vanaman V., Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures a review // In vitro, 1984, Vol.20- rr. 1 —18.

3. McGarrity G.J., Coriell L.L. Procedures to reduce contamination of cell cultures.// In vitro, 1971, Vol. 6. – rr.-257 - 265.

4. Bargutin, A.B. Opredelenie vidovoj prinadlezhnosti bakterij kontaminirujushhih kul'turu drevesnyh rastenij in vitro / A.B. Bargutin, N.V. Feoktistov, N.V. Punina [i dr.] // Tezisy IH Mezhdunarodnoj konferencii: Biologija kletok rastenij in vitro i biotehnologija. – Zvenigorod, 2008. – S. 60.

5. Falkiner F. R. Antibiotics and Antibiotic Resistance Associated Witch Plants, Fruits and Vegetables.// Proc. Int. Symp. on Merth. and Marks. for Qual. Assur. in Micro-propagation Eds. A. C. Cassels, B. M. Doyle, R. F. Curry. Acta Hort. 2000.V. 530. P. 83-91.

6. Danilova, S.A. Stimuljacija regeneracii rastenij v kul'ture tkanej kukuruzy pod dejstviem antibiotika cefotaksima / S.A. Danilova, Ju.I. Dolgih // Fiziologija rastenij.– 2004.– T.51.– №4.– S. 621-623.

7. Yepes L.M. Aldwinckle H.S. Factors that Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple and Effect of Antibiotics in Morphogenesis//Plant Cell Tissye Organ Cult.1994.V.37.P.257-269.

8. Agrawal D.C., Banerjee A.K., Kedari P.Y., Jacob S., Hazra S., Krishnamurthy R.V. Effect of Cefotaxime on the Growth of Excised Embryo-Axes of 6 Cultivars of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)//J/Plant Physiol.1998.V.152.P.580-582.

9. Mathias R.I., Mukasa C. The effect of Cefotaxime on the Growth and Regeneration of Callus from Four Varieties of Barley (*Hordeum vulgare*)//Plant Cell Rep.1987.P.454-457.

10. Borrelli G.M., Difonza N., Luppoto E. Effect of Cefotaxime on Callus Culture and Plant Regeneration in Durum Wheat // J/Plant Physiol. 1992. V.140. P.372-374.

11. Rao A.M., Sree K.P., Kishor P.B. K. Enhanced Plant Regeneration and in Grain and Sweet Sorghum by Asparagine, Proline and Cefotaxime // Plant Cell Rep. 1995. V.15. P. 72-75.