

**ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКА
ЦЕФОТАКСИМ ПРИ
КЛОНАЛЬНОМ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ
ВИНОГРАДА**

**APPLICATION OF ANTIBIOTIC
CEFOTAXIME FOR MICRO
PROPAGATION OF GRAPEVINE**

Н. П. Дорошенко

N.P. Doroshenko

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я. И. Потапенко», г. Новочеркасск, Россия, e-mail: ruswine@yandex.ru

All-Russian Research Ya.I.Potapenko Institute for Viticulture and Winemaking, Novocherkassk, Russia, e-mail: ruswine@yandex.ru

Аннотация. Исследовано действие антибиотика цефотаксим в культуре *in vitro*. Выявлено положительное влияние на оздоровление от бактериальной инфекции, увеличение числа регенерированных растений на стимуляцию морфогенеза, улучшение качественных характеристик растений.

Summary. The action of antibiotic tsefotaksim in culture *in vitro* was studied. We revealed the positive effect on sanitation from bacterial infection, on increase of number of regenerated plants, on stimulation of morphogenesis, on qualitative characteristics of plants.

Ключевые: слова: контаминация, антибактериальная химиотерапия, антибиотик цефотаксим, регенерация растений, стимуляция морфогенеза.

Keywords: contamination, antibacterial chemotherapy, antibiotic tsefotaksim, the regeneration of plants, the stimulation of morphogenesis.

При клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций. 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. Совместное культивирование в одном помещении контаминированных и свободных от микоплазм клеток уже через 1-2 пассажа приводит к инфицированию последних.

В таком случае проводят антибактериальную химиотерапию, основанную на применении антибиотиков. 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.

Цефотаксим является полусинтетическим аналогом цефалоспорины – антибиотика третьего поколения. Цефалоспорины выделяются грибами рода *Cephalosporu*, основной продуцент этого антибиотика – гриб вида *S. 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 tumifaciens* в опытах по генетической трансформации.

Характер стимуляции морфогенеза под действием цефотаксима, как предполагают С. А. Данилова, Ю. И. Долгих[1] является видоспецифичным. Показано положительное влияние на рост культивируемых тканей и морфогенез у яблони [2], хлопчатника [3], у злаковых растений [4], у твердой пшеницы. Число регенерированных растений увеличивалось под действием антибиотика в 17 раз [5]. Аналогичные результаты были получены и при применении антибиотика в культуре тканей сорго [6] 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*. Цефотаксим в концентрациях 200, 300, 400, 500, 600 мг/л 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.

Цефотаксим при добавлении его в состав питательной среды способствовал повышению регенерационной способности растений сорта Красностоп золотовский. 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.

Таблица 1

**Влияние антибиотика цефотаксим на ростовые процессы сорта
Красностоп золотовский, 2009 год**

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Корни			Высота растений, см	Число листьев, шт.	Скорость см/сут.
		число, шт.	длина, 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

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 и 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.

Повторное изучение проводилось на растениях, инфицированных в сильной степени (табл. 2).

Таблица 2

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

Варианты, мг/л	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.	Скорость см/сутки	Коэффициент полярности
		число, шт.	длина, см	ризогенная 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 регенерационная способность растений сохранялась в течение всего периода культивирования при минимальной концентрации (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 (Красностоп золотовский, Крестовский). В данном случае эффективны низкие концентрации цефотаксима 50-250 мг/л. При заражении от 15,0 до 50,0% растений (Крестовский, Памяти Кострикина) эффективность применения цефотаксима возрастает: приживаемость микрочеренков увеличивается по сравнению с контролем на 35,0-45,0%. При этом эффективны концентрации 250-450 мг/л.

На основании проведенных исследований разработан способ деконтаминации растений от микоплазменной инфекции при микроразмножении, который включает добавление в питательную среду антибиотика цефотаксим в концентрации от 50 до 450 мг/л в зависимости от степени инфицирования пробирочных растений.

Литература

1. 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-pp. – С. 621-623.

2. Yepes L. M. Aldwinckle H. S. Factors that Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple and Effect of Antibiotics in Morphogenesis//Plant Cell Tissue Organ Cult.1994.V.37.P.257-269.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.