

СИНЕРГІЧНА ДІЯ АНТИБІОТИКІВ ТИМЕНТИНУ ТА ЦЕФТРІАКСОНУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ *TRITICUM AESTIVUM*

Agrobacterium-опосередкована та біолістична трансформація – два найпоширеніші методи генетичної трансформації. Перша має ряд переваг, забезпечуючи стабільну інтеграцію ДНК в геном рослини, вбудовування меншого числа копій трансгена та зменшення кількості перестановок в геномі. Також цей спосіб забезпечує стабільну експресію трансгенів протягом багатьох поколінь порівняно з іншими методами доставки ДНК [1, 2].

Процедура *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації передбачає використання суспензії агробактерій. Проте присутність бактерії після завершення періоду спільного культивування може перешкоджати росту і розвитку трансформованих рослинних клітин або викликати загибель експлантів [3]. Також усунення бактерій необхідно для зменшення небезпеки, пов'язаної із потраплянням генетично зміненої *Agrobacterium* в навколишнє середовище. Для елімінації бактеріальних клітин під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослинні експланти переносять на середовище, що містить різні антибіотики з високим антимікробним ефектом, які і мають незначний вплив на тканини рослин і регенерацію [2].

У якості ефективного антибіотика для інгібування росту ґрунтової бактерії зазвичай використовується цефотаксим, який характеризується широким спектром дії на грампозитивні та грамнегативні бактерії. Він належить до β -lactam групи і чинить мінімальний токсичний ефект на більшість рослин [4]. У низьких концентраціях цефотаксим підвищує регенерацію пагонів у кукурудзи [5], пшениці [6, 7], яблуні [8] тощо, а підвищення концентрації знижує ефективність утворення пагонів у зазначених культур, негативно впливає на регенерацію трансформованих експлантів і ріст пагонів [9–11]. У зв'язку з цим продовжуються пошуки таких антибіотиків, які будуть підвищувати частоту та ефективність регенерації, сприяти росту рослин.

На сьогоднішній день для елімінації *A. tumefaciens* під час трансформації все частіше використовують тиментин та цефтріаксон – антибіотики β -лактамної групи. Тиментин у своєму складі містить два компоненти: тикарцилін і клавуланову кислоту. Перша складова є напівсинтетичним антибіотиком з групи пеніцилінів, підгрупи карбоксипеніцилінів, друга – інгібітором β -дактамаз. Тиментин має хімічну структуру, подібну до карбеніциліну і пеніциліну G, які проявляють ауксиноподібні властивості [12, 13]. Цефтріаксон – цефалоспориновий антибіотик четвертого покоління. Структурно він має C-3 бічний ланцюг, що складається з тiazолідиндіонів, які мають кислотні властивості. Тиментин та цефтріаксон викликають лізис бактерій шляхом специфічного втручання в біосинтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій, інгібуючи ферменти транспептидазу та карбоксипептидазу (пеніцилін-зв'язуючі білки) [14, 15]. Механізм дії цих антибіотиків на рослинний організм досі невідомий. Антибіотики можуть впливати на регенерацію експлантів пшениці, культивованих *in vitro*, як негативно [16], так і позитивно [17].

Раніше нами було встановлено, що тиментин елімінує агробактерії штамів ABI та GV3101 у концентрації 350 мг/л, а цефтріаксон – 400 мг/л [18]. Нами також встановлено, що ряд концентрацій цих антибіотиків підвищує частоту регенерації у двох генотипів пшениці з різним типом розвитку [17, 19].

З огляду на вище зазначене, метою дослідження є визначення синергічної дії антибіотиків β -лактамної групи тиментину та цефтріаксону на регенерацію *in vitro* пагонів пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. сортів Подолянка та Зимоярка.

Матеріали і методи

У дослідженні антибіотик тиментин використовували як елімінуючий агент (у концентрації 350 мг/л), а цефтріаксон – для підвищення

частоти регенерації у різних концентраціях – 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 400 мг/л.

В якості експлантів для визначення впливу на утворення калюсу з меристематичними осередками і регенерацію вибраних концентрацій досліджуваних антибіотиків використовували сформований 18-денний калюс, отриманий з апікальних меристем пшениці озимого сорту Подолянка та дворучки Зимоярка [20]. Калюс поміщали у чашки Петрі (близько 50 шт.) на регенераційне живильне середовище МС, доповнене 0,5 мг/л 6-бензиламінопурина (БАП), 0,15 мг/л піклораму [17, 20], 350 мг/л антибіотика тиментину та досліджуваними концентраціями цефтріаксону. Як контроль використовували середовище МС, доповнене 0,5 мг/л БАП та 0,15 мг/л піклораму без додавання антибіотиків. Культивування проводили за температури 24°C і 16 год фотоперіоду протягом 30-ти діб. Утворення калюсу з меристематичними зонами відзначали на 14-ту добу культивування. Утворення пагонів фіксували з 15-ї по 30-ту добу кожні 5 діб. Частоту утворення регенерантів визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили регенеранти, до загального числа експлантів.

Результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Оскільки основною проблемою під час використання антибіотиків у культурі *in vitro* є їх негативний вплив на утворення морфогенного калюсу і регенерацію, необхідно було дослідити дію тиментину та цефтріаксону на регенерацію з калюсу пшениці. Встановлено, що поєднання двох антибіотиків у живильному середовищі сприяє утворенню меристематичних зон та ризогенезу (табл. 1, 2). Числові значення цих показників є вищими порівняно з контролем. Це свідчить про позитивний ефект застосування антибіотиків тиментину та цефтріаксону.

Встановлено, що поєднання у живильному середовищі тиментину (350 мг/л) та цефтріаксону (350 мг/л) для обох досліджуваних генотипів пшениці (Зимоярка та Подолянка) стимулює утворення максимальної кількості пагонів: для сорту Зимоярка – 32,4% (контроль – 26,5%), а для сорту Подолянка – 37,8% (контроль – 25,5%).

Як видно з діаграми (рис.), синергічна дія антибіотиків носить генотип-залежний характер. За наявності у регенераційному середовищі 350 мг/л тиментину під час застосування однакових концентрацій цефтріаксону (75 та 100 мг/л) для досліджуваних генотипів пшениці спостерігали протилежний ефект. У випадку Зимоярки така кількість антибіотика пригнічувала утво-

Таблиця 1

Вплив антибіотика тиментину (350 мг/л) та цефтріаксону на морфогенез та регенерацію з калюсу пшениці м'якої сорту Зимоярка

Частота, %	Концентрація антибіотика цефтріаксону, мг/л									
	25	50	75	100	200	250	300	350	400	контроль
Утворення морфогенного калюсу	76,2±4,9	81,2±1,3	80,9±4,9	83,3±2,2	97,8±2,1	95,7±2,1	99,1±1,5	96,0±1,2	95,9±1,8	76,5±3,4
Ризогенез	55,6±2,2	54,9±4,7	51,0±0,7	57,4±3,5	78,5±0,4	54,6±1,3	69,6±4,5	59,1±3,7	61,5±2,2	75,7±4,1
Регенерація	29,4±3,2	23,1±4,7	12,5±3,4	9,8±2,1	13,9±1,4	19,8±2,1	28,6±1,1	32,4±0,5	24,9±1,9	26,5±4,4

Таблиця 2

Вплив антибіотика тиментину (350 мг/л) та цефтріаксону на морфогенез та регенерацію з калюсу пшениці м'якої сорту Подолянка

Частота, %	Концентрація антибіотика цефтріаксону, мг/л									
	25	50	75	100	200	250	300	350	400	контроль
Утворення морфогенного калюсу	93,8±4,6	93,6±0,5	94,3±1,8	96,5±2,4	90,5±4,6	94,1±3,6	97,6±2,7	95,0±3,0	97,3±2,4	55,8±4,0
Ризогенез	64,1±4,6	74,0±1,6	75,0±3,6	80,3±3,4	69,4±1,8	66,4±0,8	53,3±3,6	52,9±1,8	47,8±0,4	31,0±1,8
Регенерація	26,7±1,9	19,5±2,4	32,5±3,2	21,2±1,1	23,7±4,8	30,5±4,9	36,7±2,7	37,8±3,6	26,5±1,4	25,5±2,4



Рис. 1. Частота регенерації рослин із калюсу (%) на живильному регенераційному середовищі, доповненому тиментином (350 мг/л) та різними концентраціями цефтріаксону

рення пагонів, а у Подольанки – стимулювала їх появу та ріст.

Висновки

Поєднання у культуральному середовищі високих концентрацій β -лактамів тиментину

та цефтріаксону підвищує частоту регенерації у пшениці двох генотипів та може бути використано під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Roberta H. Smith, Elizabeth E. Hood. *Agrobacterium tumefaciens* Transformation of Monocotyledon // Crop Science. – 1995. – 35. – P. 301–309.
2. Aram Farzaneh et al. Determine Effective Concentrations of β -lactam Antibiotics Against three Strains of *Agrobacterium Tumefaciens* and Phytotoxicity on Tomato and Tobacco // International Journal of Agronomy and Plant Production. – 2013. – 4.
3. Cooke D.L., Waites W.M., Leifert C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwina carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of Aster, Cheiranthus, Delphinium, Iris and Rosa; disease development *in vivo* as a result of latent infection *in vitro* // Journal of Plant Diseases and Protection. – 1992. – P. 469–481.
4. Panathula S., Mahadev M., Naidu C. The stimulatory effects of the antimicrobial agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important anti jaundice medicinal plant // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – 5. – P. 279–285.
5. Danilova S., Dolgikh Y. The stimulatory effect of the antibiotic Cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture // Russian Journal of Plant Physiology – 2004. – 51, N 4. – P. 559–562.
6. Borrelli G.M., Di Fonzo N., Lupotto E. Effect of Cefotaxime on callus culture and plant regeneration in durum wheat // Journal of Plant Physiology. – 1992. – 140, N 3. – P. 372–374.
7. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Гончарук О.М., Лялько І.І. Вплив цефотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці // Физиология и биохимия культурных растений. – 2012. – 44, N 3. – С. 218–224.
8. James D.J., Passey A.J., Barbara D.J., Bevan M. Genetic transformation of Apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector // Plant Cell Reports. – 1989. – 7, № 8. – P. 658–661.
9. Mamidala P., Nanna R.S. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato // Plant Omics Journal. – 2009. – 2, N 4. – P. 135–140.

10. Kazemi E.M., Jonoubi P., Majd A., Pazhouhandeh M. Reduction of negative effects of Cefotaxime in tomato transformation by using FeEDDHA // *International Journal of Farming and Allied Sciences*. – 2014. – 3, N 5. – P. 538–542.
11. Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2014. – 15. – С. 16–19.
12. Costa M.G.C. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars // *Plant Cell Report*. – 2000. – 19. – P. 327–332.
13. Holford P., Newbury H.J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus* // *Plant Cell Rep*. – 1992. – 11. – P. 93–96.
14. Malathi Raghunath, Sheetal Bakal Formulation and Evaluation of a Fixed Dose Combination of Ceftriaxone Disodium and Ornidazole // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – 5, Suppl 3. – P. 750–756.
15. Tratselas A., Simitopoulou M., Giannakopoulou A., Dori I., Saoulidis S., Kollios K., Papaioannidou P., Pournaras S., Roilidesa E. Effect of Ceftriaxone on the Outcome of Murine Pyelonephritis Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – 58. – P. 7102–7111.
16. SiNae Han et al. Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo // *J. of Crop Sci. and Biotech.* – 2007. – 10. – P. 92–98.
17. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О., Моргун Б.В. Позитивний вплив антибіотику тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2015. – 17. – С. 136–140.
18. Gorbatyuk I.R. Gnatyuk I.S., Bannikova M.A. Effect of antibiotic ceftriaxone on elimination of ABI and GV3101 strains of *Agrobacterium tumefaciens* // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – 31, N 6. – P. 455–457.
19. Gnatyuk I.S., Gorbatyuk I.R., Bannikova M.O., Morgun B.V. Effect of antibiotics timentin and ceftriaxone on elimination of *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of *Triticum aestivum in vitro* // Conference for Young Scientists. Kyiv, September 21–25, 2015. – Lutsk: “VezhaPrint”, 2015. – P. 107.
20. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О., Тараненко А.М., Моргун Б.В. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка // *Физиология растений и генетика*. – 2015. – 47, N 6. – С. 514–525.

HNATIUK I.S., GORBATIUK I.R., BANNIKOVA M.A., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

SYNERGYSTIC EFFECT OF ANTIBIOTICS TIMENTIN AND CEFTRIAOXONE AT REGENERATION *IN VITRO* OF BREAD WHEAT *TRITICUM AESTIVUM*

Aim. The main requirement for antibiotics used in *Agrobacterium*-mediated transformation is the absence of toxic effects on plant organisms. The purpose of study is to determine the synergistic action of β -laktam antibiotics on *in vitro* regeneration of bread wheat *T. aestivum*. **Methods.** 18-day calli obtained from apical meristem of wheat, were used as explants to determine the effect of antibiotics on regeneration *in vitro*. Calli were placed in Petri dishes (50 pcs.) with the regeneration culture medium MS supplemented with 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine (BAP), 0.15 mg/l of picloram, 350 mg/l Timentin and 25–400 mg/l of Ceftriaxone. As a control, culture medium MS supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0.15 mg/l picloram without adding antibiotics was used. Cultivation was conducted at 24°C and 16 hours photoperiod for 30 days. The results were processed statistically using Microsoft Excel. **Results.** It was established that the combination of Timentin (350 mg/l) and Ceftriaxone (350 mg/l) in culture medium for both studied wheat genotypes (Zymoyarka and Podolyanka) stimulates the formation of the maximum number of shoots, for Zymoyarka – 32.4 % (control – 26.5 %), and for Podolyanka – 37.8% (control – 25.5%). **Conclusions.** The synergic effect of antibiotics has a genotype-dependent character. The combination of high concentrations of Timentin (350 mg/l) and Ceftriaxone (350 mg/l) in the culture medium increases the frequency of regeneration of wheat and can be efficiently used during *Agrobacterium*-mediated wheat transformation *in vitro*.

Keywords: wheat, antibiotics, regeneration, Timentin, Ceftriaxone.