

ПОЗИТИВНИЙ ВПЛИВ АНТИБІОТИКА ТИМЕНТИНУ НА ЕЛІМІНАЦІЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ *TRITICUM AESTIVUM*

Agrobacterium-опосередкована трансформація рослин – складний процес, який включає п'ять основних етапів: індукцію бактеріальної системи вірулентності, утворення Т-ДНК комплексу, перенесення Т-ДНК від *Agrobacterium* до клітини-реципієнта, інтеграцію Т-ДНК у геном рослини та експресію генів Т-ДНК. Процес трансформації залежить від багатьох факторів [1]. Встановлено, що на її ефективність впливає генотип рослини, тип експланта, генетичний вектор, бактеріальний штам, час витримування експлантів у бактеріальній суспензії, її оптична щільність, час подальшого спільного культивування, склад живильного середовища тощо. Не можна залишати поза увагою і той факт, що успішна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація неможлива без ефектної елімінації бактеріальних клітин. Антибіотики, присутні в живильному середовищі, можуть негативно впливати на регенерацію з експлантів, культивованих *in vitro* [2]. Тому, тривають пошуки «ідеального» антибіотика, який повинен бути стабільним, не залежати від рН і компонентів регенераційного середовища, не спричиняти побічних ефектів, не чинити токсичного впливу на рослинний організм, а також бути відносно дешевим.

Зазвичай, в якості ефективного антибіотика для інгібування росту агробактеріальних клітин використовують цефотаксим, який характеризується широким спектром дії на грампозитивні та грамнегативні бактерії. Він належить до β -lactum групи і чинить мінімальний токсичний ефект на більшість рослин [3]. Низька концентрація цефотаксиму підвищує регенерацію пагонів у кукурудзи [4], пшениці [5], яблуні [6] тощо, а підвищення концентрації знижує ефективність утворення пагонів у зазначених культур, негативно впливає на регенерацію трансформованих експлантів і ріст пагонів у томатів [7, 8]. З огляду на це, виникає необхідність його заміни антибіотиками, які мають м'якшу дію на рослинний організм. Одним із таких є тиментин, до складу якого входить пеніциліновий похідний тикарцилін і клавуланова кислота. Він забезпечує високий ступінь інгібування *Agrobacterium tumefaciens* і має

незначний негативний вплив на регенерацію пагонів. У деяких дослідженнях показано, що тиментин підвищує органогенез листкових експлантів *N. tabacum* [9] та сім'ядольних експлантів у томатів [10]. Cheng та співавтори зазначають, що тиментин можна розглядати як альтернативу для тих видів, в яких карбеніцилін і цефотаксим негативно впливають на регенераційний потенціал [10]. Його також можна використовувати в якості інгібітора *A. tumefaciens* під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації у прийнятих концентраціях, оскільки він не поступається за ефективністю класичним антибіотикам [12]. Проте вплив тиментину на регенераційні процеси в м'якої пшениці не вивчали.

За останні роки все більше дослідників підтримують ідею підвищення ефективності елімінації агробактерій під час генетичної трансформації шляхом комбінування антибактеріальних агентів. При використанні антибіотиків-синергістів ефективна концентрація кожного може бути знижена, відповідно зменшиться негативний побічний ефект [13]. З огляду на зазначене, метою дослідження є визначення оптимальної інгібуючої концентрації антибіотика тиментину для *Agrobacterium tumefaciens* та встановлення його впливу на регенерацію *in vitro* пагонів у м'якої пшениці *Triticum aestivum*.

Матеріали і методи

Для визначення інгібуючого ефекту антибіотиків тиментину та цефотаксиму у дослідженні використано метод дисків [12] і штам АВІ *Agrobacterium tumefaciens*. Щільний газон нічної культури агробактерій висівали на агаризоване живильне середовище Himedia M001 (аналог LB). Попередньо стерилізовані диски діаметром 6 мм змочували розчинами антибіотиків і поміщали на поверхню середовища. Досліджували інгібуючу дію антибіотиків у концентраціях: тиментин – 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л, 250 мг/л, 300 мг/л, 350 мг/л, 400 мг/л, цефотаксим – 100 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, 400 мг/л, 500 мг/л, 600 мг/л, 700 мг/л. Культивування проводили у термостаті за темпе-

Таблиця 1

Зони інгібування *A. tumefaciens* за використання антибіотиків тиментину та цефотаксиму

Концентрація цефотаксиму, мг/л	Зона інгібування, d (мм)	Концентрація тиментину, мг/л	Зона інгібування, d (мм)
100	9 ± 1,3	100	8,5 ± 0,9
200	9,8 ± 1,3	150	10,5 ± 0,5
300	10,5 ± 0,5	200	11 ± 0,5
400	11,6 ± 1,04	250	11 ± 0,5
500	12,5 ± 0,5	300	11,5 ± 0,5
600	13,3 ± 0,6	350	12,5 ± 0,3
700	16,6 ± 1,5	400	13,5 ± 0,3

ратури 27 °C протягом 48 год. По закінченні зазначеного періоду проводили лінійні виміри діаметра зон інгібування навколо дисків. Дослідження здійснювали у трьох повторностях.

В якості експлантів для визначення впливу на морфогенез і регенерацію вибраних концентрацій тестованого антибіотика використовували сформований 18-денний калюс, отриманий з апікальних меристем пшениці *T. aestivum* сорту-дворучки Зимоярка, наданого Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України [14]. Такий вибір вихідного культивуційного матеріалу зумовлено його доступністю протягом року у великих кількостях і відсутністю сезонних впливів на культури тканин [15]. Калюс поміщали у чашки Петрі (близько 50 шт.) на регенераційне живильне середовище [16], доповнене відповідними концентраціями антибіотика тиментину. Культивування проводили за температури 24 °C і 16 год фотоперіоду протягом 30-ти діб. Кількість зразків морфогенного калюсу відмічали на 14-ту добу культивування. Динаміку регенерації рослин фіксували з 15-ї по 30-ту добу кожні 5 діб. В якості контролю використовували середовище для регенерації [16]. Відсоток утворення пагонів визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили регенеранти, до загального числа експлантів.

Результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Excel. Для оцінки достовірності результатів розраховували критерії Фішера і Стюдента при $P \leq 0,05$, які становлять 7,9 та 5,5 відповідно.

Результати та обговорення

Успішна *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин, залежить від параметрів, які відповідають за ефективну доставку Т-ДНК та селекцію трансформованих клітин [12]. Елімінація агробактерій після ко-культивування з експлантами залишається одним із таких факторів.

У дослідженні порівнювали інгібуючий ефект на клітини *Agrobacterium tumefaciens* штаму АВ1 антибіотиків цефотаксиму та тиментину. За літературними даними, тиментин повністю пригнічує ріст штамів ЕНА 105, LBA 4404, GV3101, С 58 *Agrobacterium* при використанні концентрації 100–250 мг/л [2, 17], а цефотаксим – 500 мг/л (табл. 1). Нами встановлено, що зона пригнічення діаметром 12,5 мм спостерігається при використанні розчину концентрацією 350 мг/л тиментину та 500 мг/л цефотаксиму (яка є загальноприйнятною). Таким чином, тиментин більш ефективно пригнічує ріст агробактерії у порівнян-

ні з цефотаксимом. При збільшенні концентрації антибіотиків збільшується і зона інгібування *A. tumefaciens*.

Чутливість рослин до антибіотиків є видоспецифічною і залежить від концентрації антибіотика, типу експланта та умов культивування. Тому, перш ніж їх застосовувати в якості запобігання чи усунення небажаних мікроорганізмів, необхідно визначити тип і концентрацію антибактеріального агента з найменшим фітотоксичним впливом на рослинні клітини.

Для елімінації бактеріальних клітин (грам-позитивних чи грамнегативних) у культурі тканини *in vitro* слід використовувати антибіотики з широким спектром антимікробної дії, які б не чинили шкідливого впливу на ріст і регенерацію рослин. Останнім часом тиментин, який поряд із іншими препаратами (цефотаксим, карбеніцилін) належить до β -lactum групи, найчастіше використовується для контролю росту бактерій під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [17–19]. Відомо, що представники β -lactum групи інгібують біосинтез пептидоглікану – компонента клітинної стінки прокариот, що, в результаті, викликає загибель бактеріальної клітини внаслідок лізису [9, 18]. Як правило, β -лактами вважаються не токсичними для клітин рослин через їх специфічну дію на бактерії [18], але в деяких випадках продукти розпаду відповідних антибіотиків у живильному середовищі можуть по-різному впливати на ріст рослинної клітини. Таким чином, їх фітотоксичність може значно варіювати залежно від концентрації антибіотика та виду рослин [17].

Значна кількість досліджень вказує на той факт, що антибактеріальні агенти, які застосовують для елімінації бактеріальних клітин під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин впливають на частоту регенерації [4]. Механізм їхньої дії на рослинний організм достемен-

Вплив антибіотика тиментину на морфогенез та регенерацію з калюсу пшениці м'якої

Частота, %	Концентрація тиментину, мг/л					Контроль
	25 мг/л	50 мг/л	75 мг/л	100 мг/л	350 мг/л*	
Морфогенезу	95,6±2,03	95,91±1,7	93±1,2	91,2±3,4	77,5±4,5	73,7±1,4
Ризогенезу	75,42±2,61	61±4,24	76,8±2,8	75,45±2,9	60±2,7	73,4±1,6
Регенерації	19,24±2,5	19,7±2,4	8,2±1,2	17,1±2,6	35,6±2,4	26,32±1,6

Примітка: тут і далі * $P \leq 0,05$.

но не відомий, проте існує припущення, що антибіотики імітують рослинні регулятори росту, оскільки деякі з них мають ауксиноподібну структуру [18]. Стимулюючий вплив низьких концентрацій цефотаксиму на морфогенез і регенерацію було показано для калюсних культур кукурудзи [4], індійського рису [20], м'яти перцевої [21]. Активність цефотаксиму в культурі *in vitro* може бути пов'язана з його деградацією рослинними естеразами, внаслідок чого утворюються нові метаболіти, які можуть мати властивості регуляторів росту. Проте, незважаючи на позитивний ефект для багатьох видів, численні дослідження підтверджують його фітотоксичність при високих концентраціях, зокрема для груші [22].

Тиментин вважається ефективним, не лише для елімінації *A. tumefaciens* під час генетичної трансформації, а й для стимулювання регенераційних процесів [10].

Оскільки основною проблемою під час використання антибіотиків в культурі *in vitro* є їх вплив на морфогенез і регенерацію, необхідно було дослідити дію вибраних концентрацій тиментину на регенерацію з калюсу пшениці. Встановлено, що вибраний антибіотик, у цілому, сприяє утворенню меристематичних зон та ризогенезу, проте при збільшенні його концентрації до 350 мг/л спостерігається тенденція уповільнення морфогенезу (табл. 2). Слід відмітити, що попри зниження частоти морфогенезу, числові значення зазначених вище показників є вищими порівняно з контролем, що свідчить про позитивний ефект застосування тиментину.

У роботі також досліджено вплив даного антибіотика на частоту утворення пагонів. Так, при 75 мг/л спостерігалася найменша кількість регенерантів, проте відсоток утворення коренів, у даному випадку, був найбільшим. Концентрація 350 мг/л забезпечувала високий показник регенерації порівняно з іншими концентраціями та контролем (табл. 2, рис. 1, 2). Розвиток пагонів розпочинався на 2-й тиждень культивування. Щож до ризогенезу, то його відсоток виявився най-

меншим. Також слід відмітити, що під час використання тиментину некрозу калюсів і регенерантів не спостерігали. Таким чином, тиментин відзначається позитивним ефектом на морфогенетичні процеси та підвищує частоту регенерації у пшениці. Відомо, що при застосуванні даного антибіотика максимальна частота регенерації відзначалась у *Nicotiana tabacum* при 150 мг/л та у томатів при 300 мг/л [9, 10]. Не можна залишити поза увагою той факт, що використання тиментину під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів *in vitro* забезпечує вищу на 40–50 % частоту отримання трансформантів, ніж застосування цефотаксиму [23, 17].

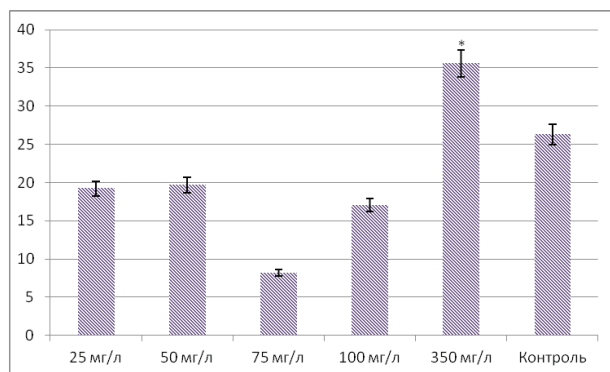


Рис. 1. Частота регенерації рослин із калюсу (%) на живильному регенераційному середовищі, доповненому тиментином у різних концентраціях

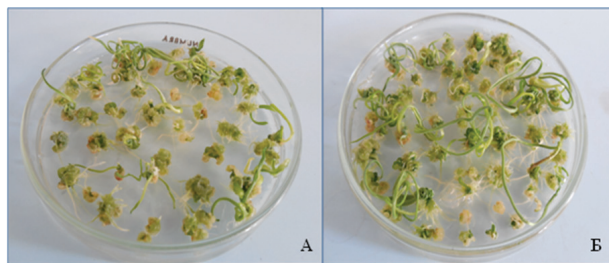


Рис. 2. Регенеранти, утворені на живильному регенераційному середовищі без тиментину – контроль (А) та за його наявності у концентрації 350 мг/л (Б)

Очевидно, ефективність тиментину залежить від компонентів, які входять до його складу, а саме клавуланової кислоти та тикарциліну. Тикарцилін є β -lactum антибіотиком і належить до групи пеніциліну, має хімічну структуру, подібну до карбеніциліну і пеніциліну G, які мають ауксиноподібні властивості [24, 10]. Вони проявляють активність, подібну до слабого природного ауксину – фенілоцтової кислоти, тим самим збільшуючи регенераційний потенціал культивованих експлантів. Клавуланова кислота (інгібітор β -лактамази) забезпечує активність тикарциліну, зводячи до мінімуму токсичний вплив на рослинний організм [9, 10]. Таким чином, досліджуваний антибіотик є перспективним і може бути використаний в культурі тканин *in vitro*, незалежно від типу експлантів. Зважаючи на те, що тиментин має невелику інгібуючу дію на регенерацію пагонів із сім'ядольних експлантів *N. tabacum*, його доцільно використовувати замість цефотаксиму, який характеризується високим ступенем пригнічення регенераційних процесів ($\approx 81\%$) [9].

Висновки

Порівнюючи інгібуючий ефект на *A. tumefaciens* антибіотиків цефотаксиму та тиментину, встановили, що тиментин більш ефективно пригнічує ріст агробактерії у порівнянні з цефотаксिमом: зони пригнічення при використанні розчинів тиментину концентрацією 350 мг/л та цефотаксиму концентрацією 500 мг/л були ідентичними за розміром. Опираючись на отримані результати, для усунення бактеріальної контамінації рекомендуємо використовувати саме тиментин.

Поряд з елімінуючою дією тиментин у концентрації 350 мг/л (у порівнянні з іншими концентраціями та контролем) сприяє збільшенню частоти морфогенезу та регенерації у пшениці м'якої *T. aestivum*.

З огляду на те, що досліджуваний антибіотик характеризується мінімальною фітотоксичністю, а також є високоефективним при елімінації агробактерій, його доцільно застосовувати під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці-дворучки сорту Зимоярка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2014. – 3. – P. 95–102.
2. Si-Nae Han, Poo-Reum Oh, Hong-Sig Kim, Hwa-Young Heo, Jun Cheol Moon, Sang-Kyu Lee, Kyung-Hee Kim, Yong-Weon Seo, Byung-Moo Lee Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2007. – 10. – P. 92–98.
3. Panathula Ch., Mahadev M., Naidu Ch. The stimulatory effects of the antimicrobial agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important antijaundice medicinal plant // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – 5. – P. 279–285.
4. 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.
5. Borrelli G., 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.
6. James D., 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, N 8. – P. 658–661.
7. Mamidala P., Nanna R.S. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato // Plant Omics Journal – 2009. – 2, N 4. – P. 135–140.
8. Kazemi E., 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.
9. Nauerby B., Billing K., Wyndaele R. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to Carbenicillin and Cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Science. – 1997. – 123, N 1–2. – P. 169–177.
10. 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.
11. Cheng Z-M., Schnurr J.A., Kapaun J.A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation // Plant Cell Rep. – 1998. – 17. – P. 646–649.
12. Priya A., Pandian S.K., Manikandan R. The effect of different antibiotics on the elimination of *Agrobacterium* and high frequency *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) // Genet. Plant Breed. – 2012. – 48. – P. 120–130.
13. Magdum S. Effect of *Agrobacterium* induced necrosis, antibiotic induced phytotoxicity and other factors in successful plant transformation // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2013. – 9, N 3. – P. 98–112.
14. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – 11. – С. 237–241.
15. Sharma V.K., Hänsch R., Mendel R.R., Schulze J. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments // Plant Breed. – 2005. – 124. – P. 242–246.

16. Gorbatyuk I.R., Baval A.V., Golubenko A.V., Morgun B.V. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka // *Biotechnologia acta*. – 2015. – 8, N 1. – P. 56–62.
17. Tang H., Ren Z., Krczal G. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut of somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants // *Plant Cell Rep.* – 2000. – 19. – P. 881–887.
18. Grzebelus E., Skop L. Effect of β -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 2014. – 50. – P. 568–575.
19. Qin Y.H., Jaime A. Teixeira da Silva, Bi H.J., Zhang S.L., Hu G.B. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics // *Plant Growth Regul.* – 2011. – 65. – P. 183–193.
20. Grewal D., Gill R., Gosal S.S. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice // *Biotechnol. J.* – 2006. – 1. – P. 1158–1162.
21. Sujana P., Naidu C.V. Influence of Bavistin, Cefotaxime, Kanamycin and Silver Thiosulphate on plant regeneration of *Mentha piperita* (L.) – An important multipurpose medicinal plant // *Journal of Phytology*. – 2011. – 3, N 5. – P. 36–40.
22. Piagnani M.C., Chiozzotto R. Shoot regeneration, *in vitro* performances of regenerated shoots and transient expression in morphogenic explants in *Prunus avium* cultivar 'Burlat C1' // *Europ. J. Hort. Sci.* – 2010. – 75, N 3. – P. 132–138.
23. Ling H.-Q., Kriseleit D., Ganai M.W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // *Plant Cell Rep.* – 1998. – 17. – P. 843–847.
24. 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.

GORBATYUK I.R., GNATYUK I.S., BANNIKOVA M.O., MORGUN B.V.

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

THE POSITIVE INFLUENCE OF ANTIBIOTIC TIMENTIN ON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ELIMINATION AND BREAD WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* REGENERATION *IN VITRO*

Aims. Effective elimination of *bacteria* is a crucial factor for efficient plant transformation. Cefotaxime is usually used to inhibit *Agrobacterium* cell growth but it inhibits plant regeneration too. So the search continues for a stable nontoxic for plants antibiotic. **Methods.** The disc diffusion method was used to show an inhibitory effect of antibiotics Timentin and Cefotaxime on *Agrobacterium tumefaciens* strain ABI. 18-day callus of *Triticum aestivum* cv. Zymoyarka was used to determine the effect of different antibiotic concentrations on morphogenesis and regeneration. **Results.** Comparing the effects of Timentin and Cefotaxime different concentrations on *Agrobacterium* it was found that Timentin is more efficient – diameter of inhibitory zone was the same for 350 mg/l Timentin and 500 mg/l Cefotaxime. The optimum concentration of Timentin (350 mg/l) for the elimination of *Agrobacterium* did not cause any necrosis but enhanced both the frequency of morphogenesis and plant regeneration. **Conclusions.** 350 mg/l Timentin completely eliminates *Agrobacterium* and increases both the frequency of regeneration and morphogenesis of bread wheat.

Keywords: *Triticum aestivum*, *in vitro* culture, Timentin, *Agrobacterium tumefaciens*, morphogenesis, regeneration.