



Wpływ cefotaksymu i karbenicyliny na żywotność i rozwój protoplastów marchwi

Ewa Grzebelus, Mikołaj Grabka, Rafał Barański

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

The effect of cefotaxime and carbenicillin on viability and development of carrot protoplasts

Summary

We examined the toxicity of two antibiotics belonging to the betalactam group, to carrot (*Daucus carota* L.) protoplasts. Leaf protoplasts were cultured in the presence of cefotaxime or carbenicillin applied in five concentrations in the range from 0.1 to 0.5 mg ml⁻¹. Cell viability, division frequency, and regeneration capacity were assessed to determine the potential toxic effect of the antibiotics. Both antibiotics significantly reduced protoplast viability and their ability to divisions. Their toxic effect intensified linearly with increasing antibiotic concentrations in the culture medium. More pronounced negative effect exhibited carbenicillin, which was evident 24 h after protoplast isolation. It also lowered cell mitotic activity two- to ten-fold, as compared to the control. Despite different reaction of cells exposed to carbenicillin and cefotaxime, callus tissue and somatic embryos were successfully obtained and allowed efficient plant regeneration. The comparison of the obtained results indicates that cefotaxime used in concentrations up to 0.2 mg ml⁻¹ can be recommended in carrot cell cultures to prevent microbial contamination.

Adres do korespondencji

Ewa Grzebelus,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Nasiennictwa,
Uniwersytet Rolniczy,
al. 29 Listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
grzebeluse@ogr.ar.krakow.pl

Key words:

antibiotics, callus, *Daucus carota*, *in vitro*, plant cell culture, somatic embryogenesis.

1. Wstęp

Częstym problemem spotykanym w kulturach *in vitro* są przypadkowe zakażenia endo- lub egzogennymi mikroorganizmami, które przyczyniają się do straty części materiału i generują do-

datkowe koszty w stosowanych procedurach. Zastosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania jest prewencyjnym działaniem mającym na celu zabezpieczenie kultur przed wystąpieniem takich zakażeń. Właściwy dobór antybiotyków jest jednak podstawowy dla skuteczności ochrony i opiera się na dwóch podstawowych założeniach, tj. muszą one ograniczać rozwój mikroorganizmów i jednocześnie nie działać toksycznie na komórki roślinne. W tym celu w roślinnych kulturach *in vitro* stosuje się dwa typy związków: 1) substancje wpływające na proces syntezy ściany komórkowej bakterii oraz 2) substancje zaburzające syntezę białek bakteryjnych. Do pierwszej grupy zalicza się m.in. antybiotyki beta-laktamowe (tj. pochodne penicyliny, np. ampicylina i karbenicylina oraz cefalosporyny, np. cefotaksym), wancomycynę oraz aerosporynę, a do drugiej, streptomycynę, kanamycynę, gentamycynę, amikacynę, tobramycynę czy rifampicynę. Antybiotyki pierwszej i drugiej grupy działają w szerokim zakresie zarówno na bakterie gramdodatnie jak i gramujemne, niemniej jednak mogą wykazywać działanie toksyczne także dla komórek roślinnych (1).

Dla ograniczenia lub eliminacji wzrostu niepożądanych mikroorganizmów antybiotyki stosowano w kulturach *in vitro* różnych gatunków m.in. eksplantatów korzeniowych żeń-szenia (2), pędów truskawki (3), pędów orzecha laskowego (4), protoplastów słonecznika (5). Wpływ tych substancji na kontrolowanie zakażeń zależy w dużym stopniu od gatunku rośliny i zastosowanego antybiotyku. Bardzo często dodatek jednego związku jest mniej efektywny w porównaniu z kombinacją kilku antybiotyków jednocześnie (3,4,6). Ponadto antybiotyki, w szczególności cefotaksym i karbenicylina, są stosowane po transformacji genetycznej eksplantatów, do eliminacji z kultury *Agrobacterium* (7,8). Oprócz ograniczenia zakażeń, antybiotyki mogą także hamować lub stymulować wzrost i rozwój eksplantatów roślinnych w kulturach *in vitro*, m.in. w trakcie indukcji i namnażania tkanki kalusowej (9), organogenezy (7,10) czy somatycznej embriogenezy (11). Ten sam antybiotyk może wpływać pozytywnie na dany proces rozwojowy u jednego gatunku, a negatywnie u innego. Dlatego konieczne jest sprawdzenie działania wybranego antybiotyku na określony eksplantat w kulturze *in vitro*.

Kultury protoplastów to technika, która może być wykorzystana do selekcji *in vitro*, transformacji genetycznej czy otrzymywania mieszańców somatycznych. Wszystkie te metody są stosunkowo złożone, czasochłonne i kosztochłonne, dlatego stosowanie antybiotyków dla ograniczenia częstotliwości rozwoju mikroorganizmów jest w pełni zasadne. Do tej pory nie monitorowano działania antybiotyków w kulturach *in vitro* marchwi. Celem pracy było zbadanie wpływu dwóch antybiotyków beta-laktamowych, tj. cefotaksymu i karbenicyliny na regenerację protoplastów marchwi, a tym samym zweryfikowanie przydatności ich stosowania w kulturach tkankowych tego gatunku.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny do izolacji protoplastów wyprowadzano w kulturach *in vitro* z nasion marchwi (odmiana 'Dolanka') dezynfekowanych powierzchniowo w trzyetapowej procedurze obejmującej ich moczenie przez 30 minut kolejno w wodzie o temperaturze 40°C, 0,2% roztworze fungicydu Bravo oraz 20% roztworze chloraminy T. Tak przygotowane nasiona kiełkowano w ciemności na pożywce MS (12), a następnie siewki przenoszono na pożywkę R* (MS z dodatkiem 100 mg l⁻¹ mezo-inozytolu, 3,0 mg l⁻¹ glicyny, 0,5 mg l⁻¹ kwasu nikotynowego, 0,1 mg l⁻¹ tiaminy, 0,1 mg l⁻¹ pirydoksyny, pH = 5,8) i umieszczano na świetle.

Protoplasty izolowano z liści i ogonków liściowych 3-4-tygodniowych roślin wg zmodyfikowanej procedury Dirks i wsp. (13). Do trawienia ścian komórkowych zastosowano roztwór zawierający: 1% celulazy Onozuka R10 (w/v, Duchefa), 0,1% pektolizazy Y-23 (w/v, Duchefa), 0,6 M mannitol, 20 mM kwas 2-morfolino-etanosulfonowy (MES) oraz 5 mM MgCl₂·6H₂O, pH = 5,6. Oczyszczone protoplasty pozyskiwano poprzez wirowanie gradientowe w roztworach sacharozy (0,5 M) i W5 (wg 14). Przed kulturą w płynnej pożywce CPP (wg 13) protoplasty immobilizowano w 2,8% roztworze alginianu sodu uzyskując kulturę o gęstości 4x10⁵ protoplastów w 1 ml zawiesiny. Po zestaleniu alginianu na pożywce agarowo-wapniowej otrzymane cienkowarstwowe płytki alginianu z unieruchomionymi protoplastami przenoszono do szalek z płynną pożywką CPP (kontrola) oraz z pożywką CPP zawierającą cefotaksym lub karbenicylinę w pięciu różnych stężeniach, tj. 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg ml⁻¹. Tak przygotowane kultury umieszczano w ciemności, w temperaturze 25°C. Po około dwóch miesiącach kultury, płytki alginianowe rozpuszczano w cytrynianie sodu, a uwolnioną masę mikrokalusów i zarodków somatycznych przenoszono do słoików na stałą pożywkę R* i umieszczano na świetle dla regeneracji w rośliny. Badania powtórzono w trzech niezależnych doświadczeniach w trzech powtórzeniach każde.

Dla określenia wpływu antybiotyków na protoplasty badano: 1) procent żywych protoplastów 24 h i 48 h po izolacji po ich wybarwieniu w 0,3% roztworze fluoesceny (FDA), 2) procent komórek wykazujących aktywność podziałową w dziesiątym i dwudziestym dniu kultury oraz 3) zdolność do regeneracji w rośliny poprzez obserwację tworzenia się tkanki kalusowej lub zarodków somatycznych, a w dalszym etapie konwersję otrzymanego materiału w rośliny. Wszystkie obserwacje mikroskopowe wykonano za pomocą mikroskopu odwróconego Axiovert S100 (Zeiss) z modułem do fluorescencji i zestawem filtrów do wizualizacji fluoresceiny (FITC, λ_{Ex} = 485 nm, λ_{Em} = 515 nm). Analizę statystyczną przeprowadzono na podstawie analizy regresji ze zmienną grupującą za pomocą programu Genstat v.11.

3. Wyniki

Po 14.-16. godzinach inkubacji tkanki w roztworze enzymów nastąpiło strawienie ściany komórkowej i uwolnienie protoplastów zarówno z mezofilu liściowego jak i ogonków liściowych. Oczyszczone protoplasty charakteryzowały się sferycznym kształtem oraz obecnością chloroplastów. Różniły się znacznie wielkością, osiągając średnicę od 10 do 70 μm . Procent żywotnych protoplastów kształtował się na poziomie 87% i obniżał się średnio do 75% po 48 h kultury. Zastosowanie antybiotyków w różnych stężeniach znacząco wpłynęło na żywotność protoplastów (rys.). Toksyczne działanie karbenicyliny ujawniło się już w pierwszej dobie kultury. W tym czasie udział żywotnych protoplastów obniżył się o 7 do 16% w stosunku do kontroli i wahał się w zakresie od 78,3 do 69,7%, odpowiednio w obecności 0,1 mg ml^{-1} i 0,5 mg ml^{-1} karbenicyliny w pożywce (tab. 1). Żywotność ta była skorelowana z zawartością karbenicyliny w pożywce ($r = -0,83$) i obniżała się liniowo wraz ze wzrostem stężenia antybiotyku ($R^2 = 0,68$; $p = 0,04$; rys.). Po 48. godzinach kultury obserwowano obumieranie kolejnych komórek. Podobnie jak po 24 h, procent żywotnych komórek obniżał się wraz ze wzrostem stężenia karbenicyliny ($R^2 = 0,79$; $p = 0,02$; rys.), przy czym obserwowano takie samo tempo obumierania niezależnie od zastosowanego stężenia karbenicyliny ($p = 0,401$). Jedynie dla najniższych stężeń (0,1-0,2 mg ml^{-1}) karbenicyliny nie zaobserwowano dalszego negatywnego wpływu antybiotyku. Efekt dodatku cefotaksymu w pożywce ujawnił się dopiero po 48 h kultury. Wówczas żywotność komórek obniżała się liniowo wraz ze wzrostem stężenia antybiotyku ($R^2 = 0,84$; $p = 0,01$; rys.) z 77,0 w kombinacji kontrolnej do 63,3% w obecności 0,5 mg ml^{-1} cefotaksymu (tab. 1). Tym samym wpływ cefotaksymu na żywotność komórek po 48 h kultury był mniej szkodliwy niż karbenicyliny ($p = 0,014$).

Tabela 1

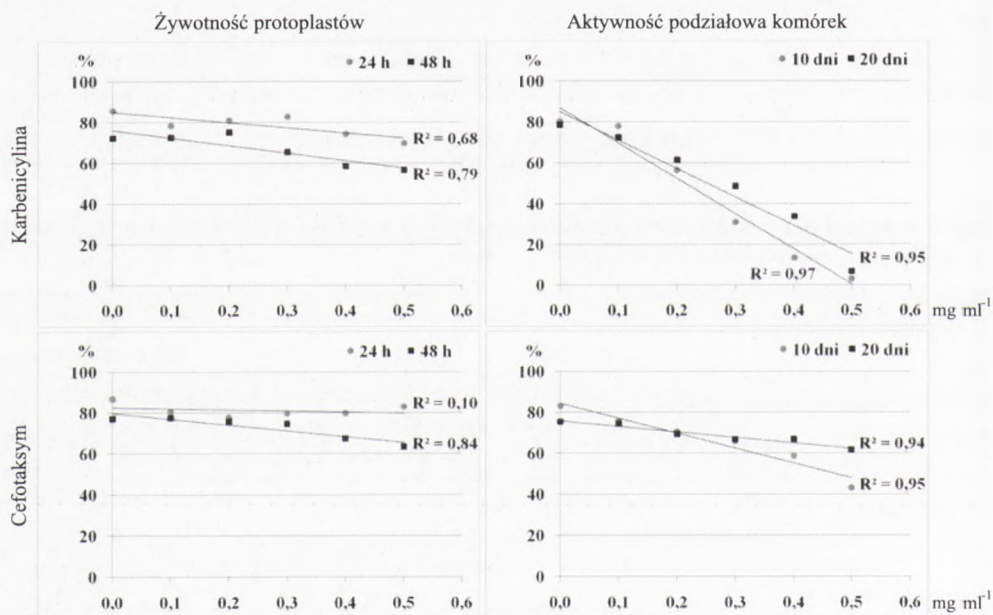
Wpływ karbenicyliny i cefotaksymu na żywotność protoplastów marchwi po 24 h i 48 h od założenia kultury oraz częstość podziałów komórek w 10. i 20. dniu kultury

| Stężenie antybiotyku [mg ml^{-1}] | | Żywotność protoplastów [% \pm bł. std.] | | Częstość podziałów [% \pm bł. std.] | |
|--|-----|---|-----------------|---------------------------------------|-------------------|
| | | 24 h | 48 h | kultura 10-dniowa | kultura 20-dniowa |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| karbenicylina | 0,0 | 85,5 \pm 1,4 | 72,2 \pm 3,3 | 80,2 \pm 2,9 | 78,6 \pm 12,4 |
| | 0,1 | 78,3 \pm 1,2 | 72,6 \pm 0,7 | 78,0 \pm 2,2 | 72,4 \pm 15,6 |
| | 0,2 | 80,9 \pm 3,1 | 75,1 \pm 4,1 | 56,5 \pm 10,9 | 61,4 \pm 17,9 |
| | 0,3 | 82,7 \pm 2,7 | 65,4 \pm 11,1 | 31,0 \pm 16,1 | 48,6 \pm 22,4 |
| | 0,4 | 74,3 \pm 6,2 | 58,5 \pm 8,9 | 13,5 \pm 11,0 | 33,8 \pm 22,5 |
| | 0,5 | 69,7 \pm 5,8 | 56,6 \pm 13,3 | 3,0 \pm 1,6 | 6,6 \pm 4,8 |
| cefotaksym | 0,0 | 86,6 \pm 0,9 | 77,0 \pm 4,0 | 83,0 \pm 7,1 | 75,4 \pm 13,3 |
| | 0,1 | 80,5 \pm 3,3 | 77,5 \pm 5,2 | 75,7 \pm 10,0 | 74,4 \pm 10,2 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|-----|------------|------------|-------------|------------|
| cefotaksym | 0,2 | 77,6 ± 3,4 | 75,7 ± 4,1 | 70,5 ± 7,3 | 69,3 ± 9,0 |
| | 0,3 | 79,5 ± 2,9 | 74,5 ± 8,6 | 66,0 ± 6,1 | 66,8 ± 9,2 |
| | 0,4 | 79,8 ± 6,2 | 67,4 ± 7,0 | 58,8 ± 7,8 | 66,8 ± 6,5 |
| | 0,5 | 82,9 ± 5,4 | 63,3 ± 8,2 | 43,2 ± 13,0 | 61,7 ± 7,8 |

Pierwsze podziały komórkowe obserwowano już po pięciu dniach od izolacji protoplastów. Kultura dziesięciodniowa charakteryzowała się licznymi agregatami dwu-, cztero- i ośmiokomórkowymi. W tym czasie liczba dzielących się komórek w kontroli średnio wynosiła 81,6%. Po dwudziestu dniach kultury przeważały agregaty wielokomórkowe. Wynikało to z faktu, że zdecydowanie mniej komórek przechodziło swoje pierwsze podziały, natomiast wcześniej powstałe agregaty powiększały swoje rozmiary na skutek nowych podziałów.

Zastosowanie antybiotyków wpłynęło także na aktywność mitotyczną komórek. Dodatek karbenicyliny powodował znaczne obniżenie częstotliwości podziałów komórkowych, która malała liniowo wraz ze wzrostem stężenia antybiotyku ($R^2 > 0,9$; $p \leq 0,001$; rys.) aż do praktycznie ich całkowitego zahamowania przy stężeniu $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (tab. 1). Udział komórek dzielących się pozostawał na takim samym po-



Rys. Wpływ karbenicyliny i cefotaksymu na żywołność protoplastów marchwi i ich aktywność podziałową (R^2 = współczynnik determinacji).

ziomie po dziesięciu i dwudziestu dniach od założenia kultury. Cefotaksym nie powodował tak drastycznego obniżenia aktywności podziałowej jak karbenicylina, chociaż również wywierał silniejszy, negatywny efekt gdy był stosowany w wyższych stężeniach. Zaobserwowano także, że dla wyższych stężeń cefotaksymu toksyczność tego antybiotyku zmalała wraz z okresem trwania kultury, co objawiło się większą częstotliwością dzielących się komórek po dwudziestu dniach kultury w porównaniu z kulturą dziesięciodniową ($p = 0,001$).

W ciągu dwóch miesięcy prowadzenia kultury obserwowano dalszy, systematyczny wzrost agregatów komórkowych w alginianie wapnia, w efekcie którego powstawały minikalusy lub zarodki somatyczne. Powstawanie tkanki kalusowej było charakterystyczne dla wszystkich zastosowanych stężeń cefotaksymu i karbenicyliny. Zarodki somatyczne pojawiły się w kulturze traktowanej cefotaksymem, ale tylko przy jego małych stężeniach ($0,1 - 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$) (tab. 2). W pożywkach z karbenicyliną zarodki tworzyły się także przy wyższych stężeniach antybiotyku. Otrzymana tkanka kalusowa i zarodki somatyczne z łatwością regenerowały w prawidłowo wykształcone rośliny. Efektywność regeneracji była jednak mniejsza w kulturach z wyższymi stężeniami antybiotyków, w szczególności niższą efektywność regeneracji obserwowano dla protoplastów traktowanych karbenicyliną w stężeniach powyżej $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, co było związane z niższą frekwencją dzielących się komórek, jak wcześniej przedstawiono.

Tabela 2

Wpływ karbenicyliny i cefotaksymu na regenerację roślin z protoplastów marchwi

| Stężenie antybiotyku [mg ml ⁻¹] | Karbenicylina | | Cefotaksym | |
|--|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | wzrost komórek w alginianie* | wydajność regeneracji** | wzrost komórek w alginianie | wydajność regeneracji |
| 0,0 | K, Z | +++ | K, Z | +++ |
| 0,1 | K, Z | +++ | K, Z | +++ |
| 0,2 | K, Z | +++ | K, Z | +++ |
| 0,3 | K, Z | ++ | K | +++ |
| 0,4 | K, Z | ++ | K | +++ |
| 0,5 | K | + | K | + |

* K – regeneracja pośrednia przez kalus, Z – rozwój roślin na drodze konwersji zarodków somatycznych;

** wydajność regeneracji: (+) < 5 roślin/szalce, (++) 5-20 roślin/szalce, (+++) > 20 roślin/szalce.

W niektórych z założonych doświadczeń wystąpiły zakażenia bakteryjne (tab. 3). Porównanie liczby zakażonych szalek wyraźnie wskazuje, że karbenicylina mało skutecznie hamowała wzrost mikroorganizmów. Jedynie kultury zawierające $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ tego antybiotyku były wolne od patogenów. Natomiast na podkreślenie zasłu-

guje fakt, że w większości przypadków dodatek do kultury już 0,1 mg ml⁻¹ cefotaksymu efektywnie ograniczał rozwój bakterii.

Tabela 3

Udział zakażeń bakteryjnych [%] w kulturach protoplastów marchwi w obecności cefotaksymu i karbenicyliny

| Antybiotyk | Stężenie antybiotyku [mg ml ⁻¹] | | | | | |
|---------------|---|------|------|------|------|-----|
| | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| karbenicylina | 20,8 | 12,5 | 20,8 | 20,8 | 20,8 | 0,0 |
| cefotaksym | 28,6 | 4,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

4. Dyskusja

Procedura izolacji protoplastów jest często wykorzystywana w badaniach obejmujących selekcję komórek w warunkach *in vitro*, transformację genetyczną czy fuzję protoplastów. Wymienione metody pozwalają na poszerzenie zmienności genetycznej gatunków uprawnych i są coraz częściej istotnym elementem programów hodowlanych (15,16). Wieloetapowość tych technik naraża prowadzone kultury komórkowe i tkankowe na przypadkowe kontaminacje grzybowe i bakteryjne, jak również sprzyja rozwojowi mikroorganizmów endogennych. Stosowanie antybiotyków jako procedura uzupełniająca zasady poprawnej techniki pracy w warunkach jałowych może być skutecznym elementem prewencji przed zakażeniami.

Na przestrzeni ostatnich trzech dekad przebadano w aspekcie ochrony przed zakażeniami bakteryjnymi lub ich eliminacji w roślinnych kulturach *in vitro* wiele antybiotyków o różnych mechanizmach działania, jak i ich kombinacji, stosując stężenia w zakresie od 0,25 do 1000 µg ml⁻¹ (1,2,4,5,17). W kulturach protoplastów słonecznika dla prewencji kontaminacji skuteczne okazało się dodanie do pożywki 250 µg ml⁻¹ cefotaksymu (5), a w kulturach pędów orzecha laskowego konieczne było stosowanie aż 500-1000 µg ml⁻¹ timentinu i 1000 µg ml⁻¹ streptomycyny jednocześnie (4). Bardzo niskie dawki mieszaniny dwóch antybiotyków (po 5 µg ml⁻¹ każdy), tj. imipenemu/ampicyliny oraz imipenemu/penicyliny G efektywnie ograniczały wzrost bakterii w kulturach wierzchołków pędów, m.in. *Spatiphyllum* sp. i *Syngonium* sp. (17). Natomiast dla eliminacji *Agrobacterium* z kultury po transformacji hypokotyli *Astragalus* stopniowo redukowano zawartość cefotaksymu w pożywce z poziomu od 500 µg ml⁻¹, poprzez 250 µg ml⁻¹ i 100 µg ml⁻¹ do 0 µg ml⁻¹ (8). W świetle cytowanych wyników zastosowane w tej pracy stężenia antybiotyków w przedziale od 100 µg ml⁻¹ do 500 µg ml⁻¹ są wystarczające dla ograniczenia wzrostu niepożądanych mikroorganizmów w kulturach tkankowych marchwi. Użycie w tym celu cefotaksymu okazało się zdecydowanie efektywniejsze w porównaniu z karbenicyliną.

Antybiotyki mogą być także wykorzystywane w roślinnych kulturach *in vitro* w celu regulacji procesów wzrostu i rozwoju. Ich działanie hormonalne wynika naj-

prawdopodobniej z faktu, że komórki metabolizują antybiotyki w związki o działaniu analogicznym do fitohormonów, które hamując biosyntezę etylenu w kulturze pozytywnie wpływają na różnicowanie się roślin (2,7,10). Stymulację procesów regeneracji roślin z różnych eksplantatów wyjściowych obserwuje się także po zastosowaniu cefotaksymu i karbenicyliny. Takie działanie cefotaksymu w dawce $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ wykazano w trakcie namnażania i elongacji pędów dla kilku genotypów buraka cukrowego (10). Z kolei mniejsza dawka cefotaksymu ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) była optymalna dla indukcji embriogenicznego kalusa w kulturach dojrzałych zarodków pszenicy, podczas gdy dodatek karbenicyliny w każdym z wybranych stężeń (tj. od 40 do $80 \mu\text{g ml}^{-1}$) nie podnosił wydajności tego procesu. Przypuszcza się, że jest to wynikiem powstającej w wyniku metabolizowania karbenicyliny fizjologicznie aktywnej auksyny, tj. NAA, która zaburzając prawidłową równowagę auksynowo-cytokininową w eksplantatach obniża ich podatność na regenerację (7). Obecność cefotaksymu w pożywce w dawkach od $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ do $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ była niezbędna do podjęcia podziałów komórkowych przez protoplasty *Passiflora edulis*, ale już niekonieczna na etapie namnażania tkanki kalusowej i regeneracji z niej pędów (18). Odmienną reakcją tkanki na antybiotyki w kulturach liścieni buraka cukrowego zaobserwował Cattlin (9). Zastosowane przez niego w różnych dawkach kanamycyna, gentamycyna, genetycyna, hygromycyna i phleomycyna redukowały zdolność eksplantatów do kalusogenezy, a tym samym wydajność regeneracji z tkanki kalusowej. Na podstawie otrzymanych przez nas wyników można przypuszczać, że zarówno cefotaksym, jak i karbenicylina działały raczej negatywnie na procesy rozwojowe komórek marchwi. Dlatego wraz ze wzrostem ich stężenia w pożywce widoczne było najpierw obniżenie żywotności protoplastów, a w konsekwencji także częstości podziałów komórek. Bardziej toksyczny wpływ na tym etapie wzrostu przejawiała karbenicylina. Jednocześnie analizując wyniki dotyczące efektywności regeneracji roślin można przypuszczać, że w porównaniu z cefotaksymem, wyższe dawki karbenicyliny nie hamowały całkowicie somatycznej embriogenezy, która jest bardziej pożądanym procesem uzyskiwania roślin.

5. Podsumowanie

Pomimo hamującego wpływu stosowanych antybiotyków na żywotność protoplastów, zdolność podziałową komórek marchwi i liczbę tworzących się zarodków somatycznych oraz tkanki kalusowej, zastosowanie cefotaksymu i karbenicyliny w badanych stężeniach pozwoliło uzyskać prawidłowo wykształcone rośliny. Zatem aplikacja tych związków do kultury protoplastów marchwi dla zabezpieczenia przed kontaminacjami bakteryjnymi wprawdzie obniża potencjał regeneracyjny komórek, ale pozostawia go na poziomie wystarczającym dla efektywnej regeneracji roślin. Słabszy negatywny efekt działania na komórki marchwi wykazywał cefotaksym, który może być z powodzeniem stosowany w kulturach protoplastów tego gatunku

w stężeniu do 0,2 mg ml⁻¹. Konsekwencją takiego doboru antybiotyku jest niewielkie ograniczenie rozwoju protoplastów przy zachowaniu zdolności kultury do tworzenia zarodków somatycznych i wysokiej wydajności regeneracji roślin oraz efektywna prewencja przed zakażeniami bakteryjnymi. Zastosowanie karbenicyliny pociąga za sobą silniejszy efekt toksycznego działania na komórki roślinne i niebezpieczeństwo znacznego ograniczenia ich populacji w kulturze, zwłaszcza jeśli będzie stosowana w stężeniu powyżej 0,2 mg ml⁻¹.

Literatura

1. Pollock K., Barfield D. G., Schields R., (1983), *Plant Cell Rep.*, 2, 36-39.
2. Teng W. L., Nicholson L., (1997), *Plant Cell Rep.*, 16, 531-535.
3. Tanprasert P., Reed B. M., (1997), *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 33, 227-230.
4. Reed B. M., Mentzer J., Tanprasert P., Yu X., (1998), *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 52, 67-70.
5. Rákosy-Tican E., Aurori A., Vesa S., Kovacs K-M., (2007), *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 90, 55-62.
6. Wilson A. A., Power J. B., (1989), *Plant Cell Rep.*, 7, 622-625.
7. Yu Y., Wei Z.-M., (2008), *Biol. Plant*, 52(3), 553-556.
8. Zhang G. N., Jia J. F., Hao J. G., Wang X. R., He T., (2008), *Biol. Plant*, 52(2), 373-376.
9. Catlin D. W., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 285-288.
10. Kaur A., Gill M. S., Ruma D., Gosal S. S., (2008), *Sugar Tech.*, 10(1), 60-64.
11. Pius J., George L., Eapen S., Rao P. S., (1993), *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 32, 91-96.
12. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant*, 18, 100-127.
13. Dirks R., Sidorov V., Tulmans C., (1996), *Theor Appl Genet.*, 93, 809-815.
14. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P., (1981), *Theor. Appl. Genet.*, 70, 590-594.
15. Švábová L., Lebeda A., (2005), *J. Phytopath.*, 153, 52-64.
16. Xiao W., Huang X., Gong Q., Dai X-M., Zhao J-T., Wei Y-R., Huang X-L., (2009), *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 97, 313-321.
17. Kneifel W., Leonhardt W., (1992), *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 29, 139-144.
18. d'Utra Vaz F. B., dos Santos A. V. P., Manders G., Cocking E. C., Davey M. R., Power J. B., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 220-225.