

Prace
eksperymentalne



Charakterystyka oporności na antybiotyki wybranych szczepów *Agrobacterium rhizogenes*

Aleksandra Królicka¹

Julianna Kurlenda²

Ewa Łojkowska¹

¹Pracownia Fitopatologii, Katedra

Biotechnologii

Międzyuczelniany Wydział

Biotechnologii

Uniwersytet Gdański

i Akademia Medyczna

Gdańsk

²Zakład Bakteriologii Klinicznej

Wojewódzki Szpital Zespolony

Gdańsk

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Agrobacterium* są gramujemnymi pałeczkami należącymi do rodziny *Rhizobiaceae*. Większość gatunków z tego rodzaju jest patogenami roślin: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* i *Agrobacterium vitis* (1). Są też wśród nich typowe saprofity, np. bakterie z gatunku *Agrobacterium radiobacter*, niewirulentne i niezdolne do wywoływania infekcji w tkankach roślinnych. Największe straty gospodarcze wywołują bakterie

z rodzaju *A. tumefaciens*, które powodują powstawanie narośli korzeniowych (tumorów) głównie na drzewach i krzewach z rodziny *Rosaceae* (2). Inny ważny gospodarczo gatunek to *A. rhizogenes*, który wywołuje powstawanie korzeni włosnikowatych (*hairy roots*) u roślin dwuliściennych (3,4). Innym efektem infekcji wywoływanej przez *A. rhizogenes* jest zniesienie efektu dominacji wierzchołkowej, skracanie międzywęźli, redukcja produkcji pyłku, a w rezultacie wytwarzania nasion (5). Cechą charakterystyczną procesu patogenezy wywołwanego przez bakterie z gatunku *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* jest przeniesienie informacji genetycznej z komórek bakteryjnych do komórek roślinnych, czyli naturalna transformacja. Proces transformacji związany jest z obecnością w komórkach *Agrobacterium* pozachromosomalnego DNA występującego w formie kowalentnie zwiniętego plazmidu wielkości około 200 tysięcy par zasad. Nazwa plazmidu pochodzi od rodzaju objawów chorobowych wywoływanych w efekcie transformacji tkanki roślinnej przez bakterie z rodzaju *Agrobacterium*. W komórkach *A. tumefaciens* występuje tzw. plazmid Ti — *tumor inducing plasmid* (6-8), a w komórkach *A. rhizogenes* plazmid Ri — *roots inducing plasmid* (9,10). Oba te plazmidy mają podobny plan budowy. Zawierają regiony kodujące funkcje koniugacji, replikacji i wirulencji (3,11) oraz region kodujący katabolizm opin. Najistotniejszą część plazmidów Ti i Ri są regiony T-DNA, czyli fragmenty DNA przenoszone do genomu roślinnego. Zawierają one m.in. geny kodujące syntezę auksyn, cytokinin i opin.

W przypadku infekcji wywołanej przez bakterie z gatunku *A. rhizogenes* proces patogenezy polega na wbudowaniu fragmentu T-DNA do genomu roślinnego, i w efekcie do zmiany programu genetycznego komórki. Fragment T-DNA jest ograniczony prawą i lewą sekwencją graniczną. Znajdujące się w obrębie T-DNA sygnały ekspresyjne TATA przy końcu 5' (dla inicjacji) i AATAAA przy końcu 3' (dla terminacji) są rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne rośliny (9). Ekspresja czterech genów *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* zlokalizowanych w odcinku T-DNA na plazmidzie Ri jest niezbędna do formowania korzeni włosnikowatych (12,13). Rola poszczególnych genów *rol* nie jest do końca poznana. W przypadku transformacji tytoniu *rolB*, jak się okazuje, jest czynnikiem istotnym w inicjacji tworzenia korzeni, a *rolA* jest odpowiedzialny za wytwarzanie korzeni włosnikowatych (14).

Transformowane bakteriami *A. rhizogenes* komórki roślinne stają się bardziej wrażliwe na syntetyzowane w tkankach hormony roślinne — auksyny i cytokiny. Następuje wydłużanie komórek i ich liczne podziały, powstaje specyficzny tumor korzeniowy, który różni się znacznie od typowych korzeni danej rośliny (15). W zainfekowanych tkankach wytwarzane są metabolity z grupy opin — pochodne aminokwasów, głównie argininy, np. agropina, mannopina, kwas agropinowy, kwas mannopinowy (16), kukumopina (17), mikimopina — stereoizomer kukumopiny (18). Są one wykorzystywane jako podstawowe źródło węgla i azotu przez zasiedlające przestrzenie międzykomórkowe bakterie z rodzaju *A. rhizogenes* (19).

Badania prowadzone nad mechanizmami patogenezy bakterii z rodzaju *Agrobacterium* doprowadziły do opracowania licznych protokołów umożliwia-

jących transformację wielu gatunków roślin. W ostatnich latach w wielu pracowniach na świecie opisano metody transformowania roślin za pomocą bakterii z gatunku *A. rhizogenes*. Zainteresowanie tymi badaniami wynika stąd, że uzyskane tą drogą transformowane korzenie mogą być cennym źródłem różnego rodzaju metabolitów wtórnych (tab. 1). Charakteryzują się one bowiem szybkim przyrostem biomasy i utrzymującą się na stałym poziomie syntezą metabolitów wtórnych. Opisano metody hodowli korzeni transformowanych na pożywkach płynnych z wytrząsaniem (20,21). Zaproponowano także zastosowanie do ich hodowli bioreaktorów mgławicowych (21). W efekcie uzyskuje się szybki przyrost korzeni tworzących gęste, rozgałęziające się kępki (22,23). W optymalnych warunkach hodowli w przypadku niektórych roślin uzyskano wyższą zawartość metabolitów wtórnych charakterystycznych dla danej rośliny w korzeniach włośnikowatych niż w korzeniach anatomicznych (21,24,25). W tkankach korzeni transformowanych może zachodzić szereg zmian w metabolizmie, a w efekcie wytwarzane są całkiem nowe, nierzadko cenne, metabolity wtórne (20,26).

TABELA 1

PRODUKCJA WTÓRNYCH METABOLITÓW W KULTURACH *IN VITRO* KORZENI WŁOŚNIKOWATYCH UZYSKANYCH W WYNIKU TRANSFORMACJI ROŚLIN BAKTERIAMI *A. rhizogenes*

Roślina	Szczep <i>A. rhizogenes</i>	Wtórne metabolity	Plon	Literatura
<i>Sesamum indicum</i>	ATCC 15834	naftochinony	645 – 1100 µg/g s.m.	(32)
<i>Lobelia inflanta</i> L.	ATCC 15834	lobelina	18 – 54 µg/g s.m.	(33)
<i>Atropa belladonna</i> L.	ATCC 15834	skopolamina atropina	0,024% s.m. 0,371% s.m.	(34)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	A 4	szikonina	5,9 mg/dzień	(24)
<i>Duboisia leichhardtii</i>	A 4	skopolamina	1,8% s.m.	(35)
<i>Chaenactis douglasii</i>	ICPB TR 7	tiarubrina	0,5% s.m.	(36)
<i>Coreopsis tinctoria</i>	LBA 9402	fenylopropanoidy	2 mg/g s.m.	(37)
<i>Datura stramonium</i>	LBA 9402	hioscyamina	0,3% s.m.	(38)
<i>Beta vulgaris</i>	LBA 9402	betacyjany	0,7 mg/l	(39)

W przypadku prowadzonej w laboratorium transformacji tkanki roślinnej bardzo istotne znaczenie ma zastosowanie odpowiedniego szczepu *A. rhizogenes*. Celem badań jest zwykle opracowanie wydajnej metody transformacji i uzyskanie szybko rosnących korzeni włośnikowatych. Bardzo ważnym zadaniem jest wyeliminowanie z uzyskanych w wyniku transformacji kultur roślinnych bakterii *A. rhizogenes*. Istotne jest zatem poznanie wrażliwości różnych szczepów *A. rhizogenes* na antybiotyki.

Przedstawione badania miały na celu określenie oporności na antybiotyki kilku najczęściej stosowanych do transformacji szczepów *A. rhizogenes*.

2. Materiały i metody

2.1 Szczepy bakteryjne i warunki hodowli

Szczepy *A. rhizogenes* scharakteryzowane w tabeli 2, uzyskano dzięki uprzejmości Krystyny Kromer (A4), Haliny Wysokińskiej (LBA9402), Frederick Bourgard (ATCC 15834, ICPB TR 7, NCPPB 8196, ATCC 11325, ICPB TR 107). Bakterie wysiewano na pożywkę stałą MYA (27) zawierającą 200 μ M acetosiringonu. Hodowlę prowadzono w ciemności, w temperaturze 26°C od 18 do 24 godzin.

TABELA 2
SZCZEPY BAKTERYJNE *A. rhizogenes* BADANE POD KĄTEM OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI
I UŻYTE DO TRANSFORMACJI TYTONIU

Szczep <i>A. rhizogenes</i>	Typ szczepu	Literatura
A4 = ATCC 31798	agropinowy	(40)
LBA 9402 = NCPPB 1855	agropinowy	(38)
ATCC 15834 = NCPPB 2629	agropinowy	(33)
ICPB TR 7 = NCPPB 2626, ATCC 25818	mannopinowy	(36)
NCPPB 8196 = LBA 9403	mannopinowy	(41)
ATCC 11325	nopalinowy	(42)
ICPB TR 107 = NCPPB 2628	kukumopinowy	(41)

ATCC = American Type Culture Collection

ICPB = International Collection of Phytopathogenic Bacteria, Berkeley, CA

NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, U.K.

PC = Phabagen Collection, The Netherlands.

2.2. Testowanie oporności szczepów *A. rhizogenes* na antybiotyki

W badaniach zastosowano szereg antybiotyków (tab. 3), należących do różnych grup, takich jak: β -laktamy, aminoglikozydy, cefalosporyny II i III generacji i fluorochinolony, których spektrum działania obejmuje m.in. pałeczki gramujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Oporność bakterii na antybiotyki badano metodą dyfuzyjno-krażkową. Badania prowadzono na podłożu agarowym Müllera-Hintona (M-H), które jest podłożem standardowym do badania oporności na antybiotyki. Krażki bibuły zawierające określone stężenie antybiotyku наносzono na pożywkę M-H inokulowaną bakteriami *A. rhizogenes* o gęstości 0,5 Mac Ferlanda. Tak przygotowane antybiogramy pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 minut (w tym czasie następuje dyfuzja antybiotyków do podłoża), a następnie inkubowano w temperaturze 26°C. Po 24 godzinach inkubacji mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krażka z określonym stężeniem antybiotyku. Wyniki porównano z tabelą wzorców i ustalano minimalną dawkę antybiotyku hamującą wzrost bakterii (MIC - *minimum inhibition concentration*) oraz minimalną dawkę skuteczną przy zwalczaniu (MIB - *minimum bactericidal concentration*).

TABELA 3
PREPARATY ZASTOSOWANE DO BADANIA OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI SZCZEPÓW *A. rhizogenes*

Nazwa polska antybiotyku	Nazwa handlowa — producent	Skrót	Grupa
Amikacyna	Amikin Polfa	AN	półsyntetyczny antybiotyk aminoglikozydowy
Aztreonam	Azactam Bristol — Myers	ATM	syntetyczny monobaktam, posiada oporność na β -laktamazy
Karbenicylina	Carbencillin Polfa Tarchomin	CAR	półsyntetyczna penicylina o szerokim spektrum, blokuje biosyntezę ściany komórkowej
Cefoperazon	Cefobid IBA Bioton	CFP	cefalosporyna III generacji, blokuje biosyntezę ściany komórkowej
Cefotaksym	Claforan Hoechst M. Roussel	CTX	cefalosporyna III generacji, blokuje biosyntezę ściany komórkowej
Ceftazydym	Biotum IBA — Bioton	CAZ	cefalosporyna III generacji, blokuje biosyntezę ściany komórkowej, oporna na działanie większości β -laktamaz
Ceftriakson	Biotrakson IBA — Bioton	CRO	cefalosporyna III generacji, blokuje biosyntezę ściany komórkowej, oporna na działanie większości β -laktamaz
Cefuroksym	Biofuroksym IBA — Bioton	CXM	cefalosporyna II generacji posiadająca oporność na wiele β -laktamaz wytwarzanych przez szczepy odporne na penicyliny
Cyprofloksacyna	Ciprofol Polfa Grodzisk Maz.	CIP	fluorochinolon nowej generacji, blokuje replikację DNA przez wiązanie z gyrazą DNA
Imipenem	Tienam MSD	MP	antybiotyk β -laktamowy z grupy karbapenemów
Netylmycyna	Netromycin Schering-Plough	NET	półsyntetyczny antybiotyk aminoglikozydowy, blokuje biosyntezę białka oraz uszkadza błonę komórkową
Piperacylina	Piperacillin Polfa Tarchomin	PIP	antybiotyk β -laktamowy blokuje syntezę ściany komórkowej
Piperacylina + Tazobactam	Tazocin Lederle	TZP	penicylina półsyntetyczna z inhibitorem β -laktamaz — tazobaktamem, blokuje biosyntezę ściany komórkowej

2. 3. Transformowanie roślin

Eksplantaty liści oraz łodyg tytoniu inokulowano igłami preparacyjnymi zawierającymi szczepy bakterii *A. rhizogenes* (tab. 2). Po inokulacji rośliny, wykładano na stałą pożywkę Murashige-Skoog (MS) (28) bez dodatku hormonów roślinnych i hodowano w ciemności w temperaturze 20 – 22°C. Po

3-5 dniach eksplantaty przenoszono na świeżą pożywkę stałą MS, zawierającą różne kombinacje antybiotyków, w celu eliminacji bakterii z kultur transformowanych organów. Pasaże powtarzano co 10-14 dni. Po osiągnięciu przez korzenie długości 1,5 – 2 cm, odcinano je od eksplantatu i pojedynczo przenoszono (1 korzeń = 1 klon) do pożywki płynnej MS z dodatkiem antybiotyków. Antybiotyki do eliminacji bakterii z tkanki roślinnej wybrano na podstawie wyników testów dyfuzyjno-krażkowych. Hodowlę korzeni włośnikowatych pasażowano co 10 – 14 dni. Korzenie hodowano w ciemności w temperaturze 22°C (z wytrząsaniem 100 rpm). Po 5 – 6 pasażach tkanki wykładano na pożywki bez antybiotyków i po kilkunastu godzinach hodowli przeprowadzano testy na obecność bakterii w pożywce.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Wpływ antybiotyków na wzrost i namnażanie bakterii z gatunku *A. rhizogenes* na pożywce syntetycznej

Badano wpływ szeregu antybiotyków wykazujących działanie bakteriostatyczne na bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* blisko spokrewnione z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*. Wpływ antybiotyków na wzrost i rozwój bakterii z gatunku *A. rhizogenes* przedstawiono w tabeli 4. Badane bakterie nie wykazały oporności na antybiotyki należące do różnych grup chemicznych: amikacynę, aztreonam, karbenicylinę, cefoperazon, ceftazydym, cefuroksym, netylmycynę, piperacylinę, piperacylinę + tazobactam. Nawet zastosowanie wysokich stężeń antybiotyku (30 – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) nie prowadziło do zahamowania wzrostu badanych bakterii (tab. 4). Wykazano, że bakterie z gatunku *A. rhizogenes* są wrażliwe na następujące antybiotyki: ceftriakson (cefalosporyna III generacji), cyprofloksacyna (fluorochinolon nowej generacji) i imipenem (antybiotyk β -laktamowy) działające bakteriostatycznie w stosunkowo niskich stężeniach (od 5 do 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), (tab. 4). Zbadano także wpływ na wzrost bakterii mieszaniny dwóch antybiotyków: karbenicyliny i cefotaksymu. Karbenicylina zastosowana pojedynczo okazała się w naszych badaniach mało skuteczna (tab. 4). Zastosowanie mieszaniny karbenicyliny (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) i cefotaksymu (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) skutecznie hamowało wzrost bakterii na pożywce M-H.

TABELA 4
WRAŻLIWOŚĆ SZCZEPÓW *A. rhizogenes* NA ANTYBIOTYKI

Antybiotyk/stężenie w krążku w µg	Szczepy <i>A. rhizogenes</i>						
	A4	LBA 9402	ATCC 15834	ICPB TR 7	NCPBP 8196	ATCC 11325	ICPB TR 107
Amikacyna 30	o	o	o	o	o	o	o
Aztreonam 30	o	o	o	o	o	o	o
Karbenicylina 100	±	±	±	o	±	±	o
Cefoperazon 75	o	o	o	o	o	o	o
Cefotaksym 30	±	±	±	o	±	±	o
Ceftazydym 30	o	o	o	o	o	o	o
Ceftriakson 30	w	w	w	o	w	w	o
Cefuroksym 30	o	o	o	o	o	o	o
Cyprofloksacyna 5	w	w	w	o	w	w	o
Imipenem 10	w	w	w	o	w	w	o
Netilmycyna 30	o	o	o	o	o	o	o
Piperacylina 100	o	o	o	o	o	o	o
Piperacylina 100 + Tazobactam 10	o	o	o	o	o	o	o
Karbenicylina 100 + Cefotaksym 30	w	w	w	w	w	w	w

w — szczep wrażliwy; o — szczep odporny

3.2. Wpływ antybiotyków na bakterie zasiedlające tkanki po transformacji i na wzrost korzeni włóśnikowatych

W badaniach wstępnych przetestowano przydatność szeregu antybiotyków, rekomendowanych przez innych badaczy jako skuteczne w zwalczaniu bakterii *A. rhizogenes* w kulturach transformowanych korzeni, ampicylina (29), kanamycyna + rimfacylina (30), spektynomycyna (31). Żaden z testowanych antybiotyków nie był w naszych badaniach skuteczny w eliminacji bakterii. Słaba efektywność wymienionych antybiotyków może wynikać stąd, że bakterie *A. rhizogenes* zastosowane do transformacji były namnażane na pożywce z dodatkiem acetosyringonu. Związek ten zwiększa wydajność transformacji, ale poprzez indukcję wzrostu i namnażania bakterii czyni je trudniejszymi do eliminacji za pomocą antybiotyków.

W celu wyeliminowania kultur *A. rhizogenes* przetestowano przydatność nowej grupy antybiotyków. Najefektywniejszym środkiem bakteriostatycznym okazała się mieszanina dwóch antybiotyków: karbenicyliny i cefotaksymu, wcześniej wykazano ich skuteczność w hamowaniu wzrostu bakterii na pożywce M-H (tab. 4). Antybiotyki te blokując biosyntezę ściany komórkowej bakterii, eliminują je z kultur nie wpływając jednocześnie na zmiany morfologii i fizjologii roślin. Spektrum działania cefotaksymu — cefalosporyny III generacji obejmuje obok pałeczek G(-) z rodziny *Enterobacteriaceae*, ziar-

TABELA 5
WPLYW ANTYBIOTYKÓW NA WZROST I ROZWÓJ KORZENI WŁOŚNIKOWATYCH

Antybiotyk/dawka w mg/l	Korzenie włośnikowate uzyskane w wyniku transformacji szczepami <i>A. rhizogenes</i>						
	A4	LBA 9402	ATCC 15834	ATCC 11325	NCPBP 8196	ICPB TR 7	ICPB TR 107
Ceftriakson 30 64 128 192	brak hamowania wzrostu bakterii; 3 niższe stężenia bez wpływu na rośliny; najwyższe stężenie wywołuje zamieranie roślin					zastosowane stężenia antybiotyków powodują zamieranie roślin	
Cyprofloksacyna A 4 8 12	brak hamowania wzrostu bakterii; 2 niższe stężenia bez wpływu na rośliny; najwyższe stężenie wywołuje zamieranie roślin					stężenie 8 mg/l powoduje zamieranie roślin	
Imipenem 10 16 32 48 64 128	brak hamowania wzrostu bakterii; 5 niższych stężeń bez wpływu na rośliny; najwyższe stężenie hamuje wzrost bakterii; najwyższe stężenie wywołuje zamieranie roślin					stężenie 32 mg/l powoduje zamieranie roślin	
Karbenicylina Cefotaksym (100 + 100)	brak hamowania wzrostu bakterii; 3 niższe stężenia bez wpływu na rośliny; zahamowanie wzrostu bakterii; mieszanina nie jest szkodliwa dla eksplantatu, korzenie transformowane rozwijają się prawidłowo						
Karbenicylina Cefotaksym (250 + 250)							
Karbenicylina Cefotaksym (400 + 400)							
Karbenicylina Cefotaksym (500 + 500)							

niaki G(+) tlenowe i beztlenowe oraz inne tlenowe G(-). Z kolei karbenicyliną — półsyntetyczna penicylina o szerokim spektrum, eliminuje pałeczki G(-, ziarniaki G(+) i G(-). W celu eliminacji bakterii z kultur należało jednak znacznie zwiększyć stężenie stosowanych środków. Jednoczesne zastosowanie obu antybiotyków, w dawce 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pożywki, skutecznie zwalczały bakterie (tab. 5). Zwykle po 5, 6 pasażach korzeni transformowanych na pożywkę z antybiotykami uzyskiwano kultury tkanek roślinnych całkowicie wolne od bakterii. W dalszych etapach hodowli korzenie włośnikowate hodowano na pożywkach bez antybiotyków. Istotne dla dalszych badań było to, że mieszanina karbenicyliny i cefotaksymu nie jest szkodliwa dla eks-

plantatu i może być bezpiecznie stosowana w kulturach korzeni transformowanych. Z wcześniejszych badań wynikało, że antybiotykiem przydatnym do kontroli bakterii z gatunku *A. rhizogenes* może być imipenem (tab. 4), antybiotyk β -laktamowy z grupy karbapenemów. Próba zastosowania imipenu do eliminacji bakterii z kultur roślinnych wykazała toksyczny wpływ tego związku na tkanki. Imipenem powodował zahamowanie wzrostu i zamieranie roślin z tego względu nie może być brany pod uwagę jako przydatny do eliminacji bakterii z transformowanych tkanek roślinnych.

Praca finansowana z projektu KBN 0819/P04/98/15.

Literatura

- Gaudin V., Vrain T., Jouanin L., (1994), *Plant Physiol. Biochem.*, 32, 11-29.
- Borecki Z., (1987), *Nauka o chorobach roślin*, PWRiL, Warszawa.
- Nester E. W., Gordon M. P., Amasino R. M., Yanofsky M. F., (1984), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 387-413.
- Tepfer D., (1990), *Physiol. Plant.*, 79, 140-146.
- Tepfer D., (1984), *Cell*, 37, 959-967.
- Birot A. M., Bouchez D., Casse-Delbart F., Durand-Tardif M., Jouanin L., Pautot V., Robaglia C., Tepfer D., Tepfer M., Tourneur J., Vilaine F., (1987), *Plant Physiol. Biochem.*, 25, 323-335.
- Flores E. H., Medina-Bolivar F., (1995), *Plant Tissue Culture and Biotechnol.*, 1(2), 59-74.
- Zaenen I., van Larebeke N., Teuchy H., van Montagu M., Schell J., (1974), *J. Mol. Biol.*, 86, 109-127.
- Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 19, 15-38.
- Hunter C. S., Neill S. J., (1990), *Methods in Molecular Biology*, 6, *Plant Cell and Tissue Culture*, Eds. Pollard J. W., Walker J. M., Humana Press, Clifton, NJ, 279-288.
- Zambryski P., (1989), *Cell*, 56, 193-201.
- Hooykaas P. J. J., Beijersbergen A. G. M., (1994), *Annu Rev. Phytopathol.*, 32, 157-179.
- Spena A., Schmulling T., Koncs C., Schell J., (1987), *EMBO J.*, 6, 3891-3899.
- Cardarelli M., Marriotti D., Pomponi M., Spano L., Capone I., Constantino P., (1987), *Mol. & Gen. Genet.*, 209, 475-480.
- Kapusta J., (1995), *Kosmos*, 44, 669-681.
- Petit A., David C., Dahl G. A., Ellis J. G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempe J., (1983), *Mol. Gen. Genet.*, 190, 204-214.
- Davioud E., Petit A., Tate M. E., Ryder M. H., Tempe J., (1988), *Phytochemistry*, 27, 2429-2433.
- Isogai A., Fukuchi N., Hayashi M., Kamada H., Suzuki A., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3235-3237.
- Orlikowska T., (1994), *Biotechnologia*, 1 (24), 32-43.
- Olszowska O., (1992), *Biotechnologia*, 4 (19), 21-26.
- Wysokinska H., Chmiel A., (1997), *Acta Biotechnol.*, 17, 131-159.
- Doran J.M., (1993), *Advan. Biochem. Engin.*, 48, 115-168.
- Sharp J. M., Doran P. M., (1990), *J. Biotechnol.*, 16, 171-186.
- Shimomura K., Sauerwein M., Ishimaru K., (1991), *Phytochemistry*, 30, 2275-2278.
- Trotin F., Moumou Y., Vasseur P., (1993), *Phytochemistry*, 32, 929-931.
- Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A., (1994), *Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Firenze, 246.
- Petit A., Tempe J., (1978), *Mol. Gen. Genet.*, 167, 147-155.
- Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant*, 15, 473-497.

29. Agostini E., Milrad de Forchetti S., Tigier H. A., (1997), *Plant Cell and Org. Cult.*, 47, 177-182.
30. Tzfira T., Vainstein A., Altman A., (1996), *Plant Tis. Cult. And Biotechnol.*, 2 (2), 109-112.
31. Beach K. H., Gresshoff P. M., (1988), *Plant Science*, 57, 73-81.
32. Ogasawara T., Chiba K., Tada M., (1993), *Phytochemistry*, 33, 1095-1098.
33. Yonemitsu H., Shimomura K., Satake M., Mochida S., Tanaka M., Endo T., Kaji A., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 307-310.
34. Kamada H., Okamura N., Satake M., Harada H., Shimomura K., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 239-242.
35. Mano Y., Ohkawa H., Yamada Y., (1989), *Plant Sci.*, 59, 191-201.
36. Constabel C. P., Towers G. H. N., (1988), *J. Plant Physiol.*, 133, 67-72.
37. Reichling J., Thron U., (1990), *Planta Med.*, 56, 488-490.
38. Payne J., Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1987), *Planta Med.*, 53 (50), 474-478.
39. Hamill J. D., Parr A. J., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 111-114.
40. Moore L., Warren G., Strobel G., (1979), *Plasmid*, 2, 617.
41. Porter J. R., (1991), *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10 (4), 387-421.
42. Ark P. A., Thompson J. P., (1961), *Phytopathology*, 51, 69.

Resistance to antibiotics of the selected species of *Agrobacterium rhizogenes*

Summary

Agrobacterium rhizogenes is used for the transformation of plant cells and production of hairy roots cultures. In the presented work the bacteriostatic activity of several antibiotics on *A. rhizogenes* strains was tested. Different concentration of antibiotics belonging to the types of cephalosporin II and III generation, β -lactam and fluoroquinolone were tested for elimination of the bacteria from transformed tissue. Out of all tested combinations, the mixture of carbenicillin and cefotaxym (claforan) was the most efficient for *A. rhizogenes* strains elimination from transformed plant tissues. The addition of those antibiotics to the regeneration medium was not toxic to plant tissues and it facilitated rapid growth of hairy roots.

Key words:

hairy roots, transformation, carbenicillin, cefotaxym.

Adres do korespondencji:

Ewa Łojkowska, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk,
e-mail: lojrowsk@biotech.univ.gda.pl