



УДК 630\*161.443.6 : 674.031.632.13

*И.И. Концевая, Л.Н. Усачева*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА ЭТАПЕ МУЛЬТИПЛИКАЦИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *BETULA OBSCURA* KOTULA EX FIEK

Исследовали влияние карбенициллина, цефотаксима, гентамицина, стрептомицина, аугментина, добавленных в питательную среду, на рост и развитие узловых сегментов побегов березы чернокорой на этапе мультипликации. Выявлено негативное воздействие присутствия в питательной среде канамицина в концентрациях 100 и 1000 мг/л и стрептомицина в концентрациях 150 и 1500 мг/л на культуру тканей березы чернокорой. На этапе мультипликации побегов наиболее оптимальным является применение цефотаксима (500 мг/л), карбенициллина, (750 мг/л), аугментина (400–500 мг/л), рифампицина (30 мг/л), ампициллина (100 мг/л). Такой режим позволяет обычно поддерживать визуально стерильную культуру тканей березы в течение длительного периода времени без негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений.

При работе с культурой клеток и тканей березы чернокорой следует придерживаться концепции совместного использования нескольких видов антибиотиков либо чередовать их применение. Не рекомендуется использовать антибиотики в каждом пассаже при рутинном размножении.

### Введение

Береза чернокорая (*Betula obscura* Kotula ex Fiek) произрастает в Украине, России, Польше, Чехии, Словакии. В Беларуси встречается сравнительно редко. На территории республики выявлено свыше 30 местонахождений в 12 географических районах [1, с. 40]. Для *B. obscura* характерна высокая декоративность древесины, что делает ее экономически важной культурой. В связи с малочисленностью, вероятным реликтовым происхождением, в силу своих биологических особенностей (наблюдаемая анеуплоидия, пониженная жизнеспособность особей и популяции в целом), принимая во внимание высокую декоративность, остро стоит вопрос о сохранении чернокорой березы [1, с. 45]. Для решения данной проблемы очень эффективно использовать метод культуры клеток и тканей. Ранее нами был предложен способ микроразмножения березы чернокорой [2, с. 236], однако вскоре встал вопрос о периодической контаминации лабораторного материала.

Следует подчеркнуть, что при работе с культурой тканей растений всегда существует проблема в инфицировании микроорганизмами пассируемого клонального материала [3, с. 2], что легко прослеживается чисто визуально. Помимо снижения жизнеспособности культур, присутствие инфекции может приводить к тканевому некрозу и значительно снижать пролиферацию побегов, способность их к быстрому росту и укоренению. Искоренить инфекцию у первичной культуры достаточно трудно. Даже при использовании в качестве первичного экспланта апикальных меристем побегов нельзя гарантировать избавление тканей от всех микроорганизмов [4, с. 134]. Дальнейшее же культивирование такого материала на богатых углеводами питательных средах стимулирует накопление микроорганизмов во внутренних межклеточных полостях, что в итоге приводит к проявлению инфекции спустя  $n$ -число пассажей.

Древесные растения характеризуются накоплением в своих тканях в процессе роста и развития различных микроорганизмов, прежде всего бактерий, фитоплазмид, грибов, вирусов. Многолетняя природа этих растений усугубляет их состояние при получении стерильных культур. Несмотря на все усилия, простерилизовать ткань обычными способами зачастую не удается, и споры, попадая при выращивании тканей



в благоприятные условия, прорастают и начинают быстро размножаться на питательных средах. В практике микроклонального размножения для подавления такой внутренней инфекции часто в питательную среду вводят различные антибиотики. По мнению некоторых исследователей [5, с. 157], оптимальным является периодическое добавление антибиотиков в питательную среду, когда рост растительной ткани подавляется минимально, а бактерий – максимально.

Использование антибиотиков для уменьшения или предотвращения микробной контаминации культуры тканей на длительный период культивирования имеет определенные ограничения. Во-первых, антибиотики – дорогостоящие антибактериальные средства; во-вторых, они эффективны обычно только против бактерий, причем, довольно узкого круга; в-третьих, они обычно термолabile; в четвертых, оказывают влияние на рост растительной ткани: их эффект может стимулировать либо, наоборот, ингибировать рост и развитие микрорастений в результате токсичного действия [6, с. 615; 7, с. 118]. Кроме того, постоянное применение антибиотиков может привести к появлению резистентных штаммов бактерий.

Антибиотики тестированы по их бактериостатической и бактерицидной способности в отношении к разным видам бактерий и другим микроорганизмам, обитающим в культуре тканей растений. По данным лабораторий фитотехнологии (PhytoTechnology Laboratories, USA), чувствительность культуры тканей разных видов растений к одним и тем же антибиотиками может быть различной. Однако если исследования по воздействию антибиотиков на клеточные культуры различных сельскохозяйственных растений довольно многочисленны и активно проводятся не одно десятилетие, то в культуре древесных растений использование антибиотиков ограничивается обычно генно-инженерными технологиями.

Определение взаимоотношений между культивируемым *in vitro* материалом того или иного вида растений и антибактериальным агентом является важной и актуальной проблемой микроклонального размножения, особенно древесных насаждений, которая требует при рассмотрении комплексного подхода, с использованием знаний и методов самых разных биологических дисциплин. Несомненно, актуальность данной проблемы возрастает в биотехнологических исследованиях в области растениеводства, в частности, при получении трансгенных растений.

Цель данного исследования – изучение влияния некоторых антибиотиков, добавленных в питательную среду, на рост и развитие узловых сегментов побегов березы чернокорой на этапе мультипликации микроклонального размножения.

#### **Объекты и методы исследования**

В качестве объектов исследования использовали клон ч1 березы чернокорой. Выбранный клон характеризуется высоким морфогенным потенциалом [8, с. 226] и может быть рекомендован как модель для биотехнологических лесных исследований по аналогии с представителями рода *Populus*.

Субкультивирование микрорастений обычно выполняли каждые 30 дней на свежую безгормональную среду. Для снижения уровня бактериальной контаминации материала в течение двух последних лет периодически использовали также среду, дополненную цефотаксимом в концентрации 500–750 мг/л. В асептических условиях нарезали однопочечные сегменты побегов длиной 0,5–1,0 см с листом или без листа. Затем экспланты в вертикальной ориентации помещали на агаризованную среду. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей, оптимизированная для древесных (WPM) [9, с. 426]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге



и Скуга [10, с. 496]; pH среды перед стерилизацией доводили до 5,6–5,8. Автоклавировали среды при 1,1 атм в течение 20 мин. Тестировали следующие антибиотики: цефотаксим (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь); карбенициллин (ЗАО «Брынцалов-А», Россия); ампициллин (ампициллина натриевая соль) (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь), тетрациклин (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), канамицин (ЗАО «Брынцалов-А», Россия), рифампицин (Holden Medical B.V., Нидерланды), гентамицин (гентамицина сульфат), (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь); стрептомицин (стрептомицина сульфат); (ЗАО «Брынцалов-А», Россия), аугментин («СмитКляйн Бичем Фармасьютикалз», Великобритания). При выборе концентраций антибиотиков для некоторых из них исходили из концентраций, предлагаемой в информации PhytoTechnology Laboratories. Большая же часть концентраций антибиотиков была выбрана на основании предварительных наших исследований. Антибиотики добавляли в стерильных условиях в охлажденную до 45° С агаризованную среду, после чего проводили ее разлив по стерильным культуральным сосудам объемом 200 мл. В качестве контроля использовали модифицированную среду WPM без добавления фитогормонов и других биологически активных веществ (WPM, б/г).

Материал культивировали в оптимальных условиях: при температуре  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , с фотопериодом 16 часов и освещенностью 3 тыс. лк. Число повторностей в каждом варианте составило 20. Оценку материала проводили спустя 30 дней. Чистоту растительного материала оценивали визуально по следующей шкале: «-» – отсутствие бактериальной инфекции, «+» – слабая вуаль в глубине питательной среды, «++» – сильная вуаль в глубине питательной среды, «+++» – сильная поверхностная инфекция. Учитывали процент эксплантов с признаками хлороза и некроза, способность их к побегообразованию. Определяли морфологические параметры сформировавшихся растений (высоту побегов, число листьев и корней, степень развития корней). Последний параметр оценивали по трехбалльной шкале: 1 – слабое развитие корневой системы (наличие 1–5 корней с длиной не более 1 см); 2 – среднее развитие корней (наличие более 3 корней с длиной свыше 1 см с единичными боковыми и придаточными корнями); 3 – сильное развитие корневой системы (наличие более 3 корней с длиной свыше 3 см с развитыми боковыми и придаточными корнями). Был выполнен статистический анализ на основе программ *Microsoft Excel*. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем вычисляли критерий t-Стьюдента.

Для выявления последующего эффекта антибиотиков на органогенную способность растений березы чернокорой спустя 30 дней от каждого варианта пассировали на свежую безгормональную среду WPM по 20 штук однопочечных сегментов побегов, которые культивировали при оптимальных условиях в течение 4 недель. После этого визуально оценивали способность эксплантов к дальнейшему росту и развитию и возможность формирования полноценных растений.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Проведенные исследования показали, что используемый материал березы чернокорой характеризовался накоплением в своих тканях значительного количества бактериальной инфекции. Об этом свидетельствует сильный рост бактерий на поверхности питательной среды в контрольном варианте и на среде, дополненной цефотаксимом. По нашему предположению, отсутствие антибактериального эффекта цефотаксима может свидетельствовать в первую очередь о формировании устойчивых штаммов бактерий к данному антибиотику, поскольку он периодически использовался в составе питательных сред, и (в меньшей степени) о присутствии в тканях растений видов бактерий, на кото-



рых цефотаксим не оказывает антимикробного действия. Также установлено, что стрептомицин даже в очень высокой концентрации – 1500 мг/л – не оказывает губительного воздействия на штаммы бактерий, присутствующие в исследованной культуре тканей березы (таблица 1). В этом варианте отмечали наличие инфекции у основания эксплантов.

Таблица 1 – Влияние антибиотиков на развитие микрорастений березы чернокорой

Антибиотики, концентрация в мг/л	Инфицированность среды	Хлороз, %	Некроз, %	Средняя высота растений, ( $x \pm S_x$ ), см	Корни	
					наличие у эксплантов, %	степень развития
WPM, б/г (контроль)	+++	0	0	1,8±0,2	100	1
цефотаксим, 500	+++	0	0	2,2±0,5	90	1
карбенициллин, 750	–	0	0	1,7±0,2	100	1; 2
цефотаксим, 500 + карбенициллин, 750	–	0	0	2,5±0,3	100	2; 3
аугментин, 400	–	0	0	3,2±0,5*	100	3
аугментин, 500	–	0	10,0	2,8±0,3*	100	3
аугментин, 800	–	0	25,0	3,5±0,5*	90	3
аугментин, 300 + це- фотаксим, 500	–	0	0	2,8±0,4*	100	1; 2
гентамицин, 50	–	0	0	1,4±0,2	0	0
канамицин, 100	–	0	10,0	1,5±0,2	0	0
канамицин, 1000	–	90,0	10,0	1,0±0,1**	0	0
тетрациклин, 20	–	0	10,0	1,2±0,2*	0	0
стрептомицин, 150	+++	0	10,0	1,0±0,1**	0	0
стрептомицин, 1500	+++	100	0	0,8±0,1**	0	0
рифампицин, 30	–	0	0	3,0±0,3*	100	2
ампициллин, 100	–	0	0	3,8±0,4**	100	2
ампициллин, 1000	–	5,0	10,0	1,5±0,2	60,0	1; 2
ампициллин, 100 + цефотаксим, 500	–	0	5,0	2,5±0,3	50,0	0; 1
ампициллин, 1000 + цефотаксим, 500	–	0	0	1,2±0,2	20,0	1
ампициллин, 700 + цефотаксим, 500	–	0	5,0	2,5±0,3	10,0	1
рифампицин, 30 + цефотаксим, 500	–	0	20,0	1,8±0,2	100	1
тетрациклин, 20 + цефотаксим, 500	–	0	5,0	2,0±0,3	100	1
гентамицин, 50 + це- фотаксим, 500	–	0	0	0,9±0,1**	0	0

Примечание: уровень значимости при \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

При культивировании микрорастений на средах, дополненных гентамицином, канамицином, тетрациклином, стрептомицином, выявлено сильное подавление роста



и развития эксплантов. На каждой тестируемой среде отмечали у 10% эксплантов полную гибель. Остальные жизнеспособные экспланты характеризовались отсутствием роста побегов либо минимальным ростом. При высоких концентрациях стрептомицина (1500 мг/л) и канамицина (1000 мг/л) наблюдали появление белых, лишенных хлорофилла листьев. Индукция корней отсутствовала у всех эксплантов.

При добавлении в состав питательной среды цефотаксима (500 мг/л), карбенициллина (750 мг/л), аугментина (400–500 мг/л), рифампицина (30 мг/л) и ампициллина в концентрации 100 мг/л не установлено негативного их воздействия на развитие эксплантов. В вариантах с применением аугментина, рифампицина и ампициллина отмечали даже стимулирование ростовых процессов. Наблюдалось достаточно активный рост побегов в высоту, формирование зеленых листьев, стабильное корнеобразование. Присутствие аугментина в составе питательных сред вызывало существенное увеличение параметров ризогенеза практически у всех микрорастений, в результате формировались более мощные корни, чем в контроле.

Использование цефотаксима в комбинации с другими антибиотиками в большинстве исследованных вариантов не оказывало существенного влияния на изменение параметра «средняя высота растений». Исключение составляет вариант с применением аугментина, когда средняя высота растений возрастала, и вариант с применением гентамицина, когда отсутствовали признаки развития эксплантов. Комбинированное использование антибиотиков в ряде вариантов повлияло на развитие корневой системы. Совместное добавление цефотаксима и тетрациклина в питательную среду стимулировало у всех эксплантов в слабой степени ризогенез, который был подавлен в присутствии одного тетрациклина. В вариантах применения цефотаксима (500 мг/л) и ампициллина (100–1000 мг/л) их совместный эффект, наоборот, подавлял процесс корнеобразования по сравнению с вариантами сред, где присутствовал только ампициллин.

При последующем субкультивировании экспериментального растительного материала со среды, дополненной тем или иным антибиотиком, на безгормональную среду, была визуально оценена эффективность использования антибиотиков в предыдущем пассаже для получения чистого материала (избавления от бактериальной инфекции). Появление бактериальной инфекции отмечали в контроле и в вариантах с применением цефотаксима либо карбенициллина. В этих вариантах рост микрорастений из-за контаминации тканей был существенно подавлен. Установлено, что высокие концентрации стрептомицина (1500 мг/л) и канамицина (1000 мг/л) в среде культивирования первого пассажа приводили во втором пассаже к гибели эксплантов, вызывая некроз тканей. Более низкие концентрации этих антибиотиков, а также воздействие тетрациклина, существенно подавляли ростовые процессы эксплантов. В итоге формировались слабые микропобеги, как и в предыдущем пассаже. В остальных опытных вариантах не установлено значительного негативного воздействия исследованных антибиотиков на рост и развитие эксплантов.

Несмотря на все негативные моменты, которые оказывают антибиотики на тканевые культуры растений, использование химических веществ, обладающих антибактериальным эффектом, является, по-видимому, обязательным условием успешной работы. Однако следует учитывать разнообразные функции воздействия данного класса веществ, их токсичность на определенные виды микроорганизмов и токсичность на растительные ткани.

Апробированные антибиотики в зависимости от механизма их действия на бактериальную клетку делятся на несколько групп и имеют следующие характеристики



[11, с. 90]. Ампициллин и цефалоспорины (цефотаксим и карбенициллин) относятся к фармакотерапевтической группе пенициллин полусинтетический. Эти антибиотики эффективны в относительно низких дозах, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот, действуют бактерицидно, подавляя синтез клеточной стенки бактерий. Высокоактивны в отношении многих грамотрицательных бактерий, проявляют активность в отношении грамположительных бактерий. Аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, канамицин, гентамицин) и тетрациклин (из группы тетрациклинов) связываются с 30 S-субъединицей рибосом, что прекращает биосинтез белка. Являются бактериостатическими антибиотиками широкого спектра действия. Полусинтетический антибиотик рифампицин активен в отношении множественно-устойчивых штаммов бактерий, в том числе грамположительных. Механизм его действия на бактериальную клетку обусловлен подавлением синтеза РНК. Аугментин (амоксициллин + клавулановая кислота) – из четвертого поколения антибиотиков. Он оказывает бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Перечисленные антибиотики высокоактивны в отношении многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. Они широко используются при работе с культурой клеток и тканей растительного происхождения, прежде всего в опытах по генетической трансформации [12 с. 213].

Исследования по влиянию антибиотиков на клеточные культуры различных сельскохозяйственных растений довольно многочисленны. Так, на подсолнечнике было выявлено, что в слабых концентрациях пенициллин, стрептомицин, бацитрацин, тетрациклин значительно стимулируют рост нормальной ткани, а при повышенной концентрации вызывают его угнетение [6, с. 616]. При размножении картофеля добавление смеси антибиотиков в питательную среду не позволило элиминировать бактериальную инфекцию, зато развитие растений было подавлено, отмечался некроз и хлороз листьев и побегов [7, с. 119].

Вышесказанное в полной мере согласуется с результатами нашего эксперимента (таблица 1). При увеличении в питательной среде концентрации аугментина и ампициллина наблюдали угнетение роста и развития эксплантов, при слабых концентрациях антибиотиков отмечали стимулирование ростовых процессов у микрорастений. Использование стрептомицина как при низкой (150 мг/л), так и при высокой (1500 мг/л) концентрации, не позволило избавиться от бактериальной инфекции, в то время как было отмечено существенное угнетение развития культур, а при более высокой концентрации антибиотика даже с признаками хлороза у всех эксплантов.

Имеются сведения о влиянии антибиотиков на клеточном и молекулярном уровнях. Установлен эффект пенициллинов на активность ферментов азотного метаболизма, изменение ультраструктурных элементов клетки и биохимических процессов, имевшие место в стабилизированной культуре каллуса, полученного из мезофилла листа *Sedum telephium* L. [13, с. 124]. В культуре тканей растений пшеницы, произрастающих на средах, дополненных разными формами пенициллинов, было отмечено усиление многих метаболических процессов, возрастало содержание хлорофиллов, увеличивались размеры митохондрий. Как было установлено, бензилпенициллин активизирует пролиферацию растительных клеток, ускоряя клеточный цикл, что ведет к усилению мутагенеза за счет повреждения хромосом. Цефотаксим ингибирует пролиферацию клеток пшеницы, удлиняя клеточный цикл в период метафазы и индуцируя мутации за счет повреждения хромосом и митотического аппарата [14, с. 90]. Показано, что при



определенных концентрациях такие антибиотики, как стрептомицин, эритромицин, рифампицин, рифамицин, могут вызывать мутации у различных растений [12, с. 219].

На крестоцветных растениях в результате обработки семян антибиотиками получена стабильная хлорофиллдефектность [15, с. 472]. Обработка семян ячменя стрептомицином (5 г/л в течение 14 часов) вызвала полное подавление способности растений синтезировать 5-аминолевулиновую кислоту, предназначенную для образования хлорофилла. Получали листья с белой тканью [16, с. 446]. Описана токсичность свыше 20 различных антибиотиков на клетки протопластов *Nicotiana plumbaginifolia*. Из них стрептомицин, канамицин, тетрациклин сильнее всего ингибировали рост протопластов.

Полученные нами результаты с использованием стрептомицина и канамицина, как при более низких, так и при более высоких концентрациях свидетельствуют о мутационных изменениях, которые в первом пассаже при высоких концентрациях выразились в хлорофиллдефектности, а во втором пассаже – в некрозе и полном отсутствии развития эксплантов (таблица 1).

На многих сельскохозяйственных растениях установлено стимулирование роста клеток растений при ингибировании роста микробов в результате добавления в состав питательной среды цефотаксима и карбенициллина [17, с. 38]. На березе чернокорой в результате эксперимента также установлен позитивный эффект цефалоспориновых антибиотиков.

Рифампицин – наиболее используемый антибиотик в культуре тканей растений, в том числе древесных, поскольку имеет широкий спектр антибактериального действия и практически не подавляет рост и дифференциацию клеток [18, с. 208]. В культуре *Helianthus tuberosus* было показано, что из 6 тестируемых антибиотиков только рифампицин был способен контролировать бактериальную инфекцию без негативного влияния на синтез ДНК, скорость деления клеток растений, их дифференциацию в тканях эксплантов. Однако рифампицин предотвращает увеличение белкового синтеза [19, с. 239]. Применение рифампицина в нашем исследовании позволило подавить бактериальную контаминацию и при этом сохранить в норме рост и развитие микрорастений березы чернокорой.

При использовании антибиотиков на этапе микроразмножения лесных древесных растений было показано, что отдельный антибиотик не был эффективен против эндогенной бактериальной инфекции [20, с. 208; 21, с. 73]. Трудность применения антибиотиков для культуры растительных тканей заключается в том, что спектр бактерицидного действия каждого из них довольно узок, а среди облигатных паразитов растительных тканей встречаются микроорганизмы, весьма разнообразные по систематическому положению. Помимо этого, нельзя применять один вид антибиотиков на этапе мультипликации побегов длительное время, поскольку могут быть получены устойчивые штаммы бактерий [22, с. 22]. По-видимому, это имело место в нашем эксперименте в вариантах с использованием цефотаксима или карбенициллина, когда наблюдали для первого из антибиотиков стойкую бактериальную инфекцию в обоих пассажах, а для второго антибиотика – только во втором пассаже. Оба антибиотика принадлежат к одной группе цефалоспориновых антибиотиков, и, несомненно, спектр их действия на многие виды и штаммы бактерий пересекается. Поэтому вполне ожидаемо, что и карбенициллин оказался уже неэффективен для подавления роста бактерий и их гибели в тестируемой культуре тканей березы чернокорой.

Использование комбинации нескольких антибиотиков в составе питательной среды при работе с культурой клеток растений, как показано J.H. Dodds & L.W. Roberts



[22, с. 22], является намного эффективнее. Такой подход не только позволит расширить спектр действия антибиотиков на микроорганизмы, но и при соответствующем грамотном подборе комбинаций антибиотиков будет способствовать сохранению ростовых процессов растений в полном объеме, как это было выявлено для большинства вариантов, протестированных в нашем исследовании для березы чернокорой (таблица 1). Тем не менее сохраняется риск увеличения соматоклональной изменчивости в результате использования антибиотиков [23, с. 285].

Для снижения мутационного пресса предлагается проводить регулярное тестирование по морфологическим, а при необходимости – цитогенетическим, биохимическим или молекулярно-генетическим показателям выборочных экземпляров отдельных микроклонов, культивированных *in vitro*.

### Заклучение

1. На этапе мультипликации побегов березы чернокорой наиболее оптимальным является добавление в питательную среду следующих концентраций антибиотиков: карбенициллина (750 мг/л), аугментина (400–500 мг/л), рифампицина (30 мг/л), ампициллина (100 мг/л), цефотаксима (500 мг/л) в сочетании с карбенициллином (750 мг/л) или аугментином (300 мг/л). Такой режим позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей без существенного негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений и их жизнеспособность.

2. Выявлено негативное воздействие присутствия в питательной среде канамицина в концентрации 100 и 1000 мг/л и стрептомицина в концентрации 150 и 1500 мг/л на рост и развитие однопочечных сегментов побегов березы чернокорой. Субкультивирование эксплантов на свежие безгормональные среды индуцирует их гибель либо (при сохранении жизнеспособности) существенно подавляет ростовые процессы. Тестированные высокие концентрации этих антибиотиков вызывают у всех эксплантов хлорофиллдефектность.

3. При работе с культурой клеток и тканей березы чернокорой для поддержания ее стерильности в течение длительного периода времени следует придерживаться концепции совместного использования нескольких видов антибиотиков, различающихся по механизму их воздействия на бактериальную клетку и с разным спектром действия на микроорганизмы, либо чередовать их применение. Не рекомендуется использовать антибиотики в каждом пассаже при рутинном размножении.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Побирушко, В.Ф. Биологические особенности и изменчивость *Betula obscura* Kotula ex Fiek / В.Ф. Побирушко // Сб. науч. тр. / Ин-т экспериментальной ботаники НАН Беларуси. – Минск, 1992. – Т. 31 : Ботаника. – С. 39–46.
2. Концевая, И.И. Микроразмножение *Betula obscura* Kotula ex Fiek / И.И. Концевая, А.А. Яцына // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология : мат. межд. конф., Минск, 24–26 ноября 2004 г. – Минск, 2004. – С. 236–238.
3. Cassells, A.C. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation – an overview / A.C. Cassells // Pathogen and microbial contamination management in micropropagation / Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. – 1997. – P. 1–14.
4. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture / P. Boxus [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – Berlin : Springer–Verlag, 1977. – P. 130–135.





5. Hennig, F. Untersuchungen zur in vitro-Verklonung von systematisch bakteriell verseuchtem Pflanzenmaterial / F. Hennig, K.T. Hänsch // Akad. Landwirtschaftswiss. DDR. – 1989. – № 281. – S. 153–159.
6. Nickell, L.G. Stimulation of plant growth by antibiotics / L.G. Nickell // Proc. Soc. Exptl. Biol. – 1952. – V 80. – P. 615–617.
7. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures / J.E. Gilbert [et al.] // Annals of Applied Biology. – 1991. – V. 119, № 1. – P. 113–120.
8. Концевая, И.И. Изучение морфогенеза в культуре тканей листьев *Betula obscura* Kotula ex Fieх. / И.И. Концевая, А.А. Яцына // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2005. – Вып. 64 : Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 219–227.
9. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laured, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – № 30. – P. 421–427.
10. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.
11. Ieamkhang, S. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation / S. Ieamkhang, O. Chatchawankanpanich // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – V. 82, № 2. – P. 213–220.
12. Лысак, В.В. Микробиология : учеб. пособие / В.В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 399 с.
13. Santos, I. Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue cultures / I. Santos, R. Salema // Plant. Sci. – 1989. – V. 59, № 1. – P. 119–125.
14. Цитогенотоксические эффекты бета-лактамов антибиотиков. Сообщение 1. Тест на индукцию повреждения митотических хромосом в клетках корневой меристемы пшеницы / Ю.В. Редикин [и др.] // Учен. зап. биол. фак. ОмГПУ. – 1996. – № 5. – С. 77–92.
15. Зубко, М.К. Стабильная хлорофиллдефектность, индуцированная у крестоцветных растений с помощью антибиотиков / М.К. Зубко // Физиология и биохимия культурных растений. – 1999. – Т. 31, № 6. – С. 467–473.
16. Влияние кинетина на активность начальных этапов биосинтеза хлорофилла в обработанных стрептомицином проростках ячменя / Е.Б. Яронская [и др.] // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 440–448.
17. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures / K. Pollock [et al.] // Plant Cell Reports. – 1983. – V. 2. – P. 36–39.
18. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants / P.M. Young [et al.] // Plant Sci. Lett. – 1984. – V. 34. – P. 203–209.
19. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus* / R. Phillips [et al.] // Plant Science Letters. – 1981. – V. 21. – P. 235–240.
20. Young, P.M. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants / P.M. Young [et al.] // Plant Sci. Lett. – 1984. – V. 34. – P. 203–209.
21. Mentzer, J. Effect of antibiotics on internal bacterial contamination of micropropagation hazelnut / J. Mentzer, P. Tanprasert // In Vitro Cell and Dev. Biol. Anim. – 1996. – V. 32, № 3, Pt. 2. – P.74 A.



22. Dodds, J.H. Experiments in plant tissue culture. Aseptic techniques / J.H. Dodds, L.W. Roberts // Cambridge : Cambridge Univ. Press. U.K. – 1982. – 24 p.

23. Somaclonal variation and genomic flux / W.R. Scowcroft [et al.] // Plant Tissue and Cell Culture (Eds. Green, Somers, Hackett, Biesboer). Alan A. R. Liss. N.Y. – 1992. – V. 3. – P. 275–286.

***I.I. Kontsevaya, L.N. Usachiova. Use of Antibiotics at the Stage of Multiplication of Microclonal Reproduction *Betula Obscura* Kotula ex Fiek***

The influence of карбенициллина, цефотаксима, gentamycin, streptomycin, аугментина, added in a nutrient medium, on the growth and development of central segments of sprouts of *BETULA OBSCURA* at an animation stage is investigated. Negative influence of kanamicin presence in nutrient medium in concentration of 100 both 1000 mg/l and streptomycin in concentration of 150 and 1500 mg/l on tissue culture *BETULA OBSCURA* is revealed. At the stage of sprout multiplication of the use of цефотаксима (500 mg/l), карбенициллина, (750 mg/l), аугментина (400-500 mg/l), rifampicin (30 mg/l), ampicillin (100 mg/l) is the most optimal. Such mode allows supporting sterile tissue culture of the birch visually during the long period of time, without negative influence on morphometric parameters of micro plants.

Working with tissue and cell culture of *BETULA OBSCURA* it is necessary to adhere to the concept of combined use of several kinds of antibiotics or to alternate their application. It is not recommended to use antibiotics in each passage at routine reproduction.

Рукапіс паступіў у рэдкалегію 09.06.2010