ЛЕСОВЕДЕНИЕ, 2011, № 1, с. 45–51

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 630*161.443.6: 674.031.632.13

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ БЕРЕЗЫ

© 2011 г. И. И. Концевая

Институт леса НАН Беларуси
246001 Гомель, ул. Пролетарская, 71
E-mail: ikantsavaya@mail.ru
Поступила в редакцию 21.05.2008 г.

Исследовали влияние карбенициллина, цефотаксима, гентамицина, стрептомицина, аугментина, добавленных в питательную среду, на рост и развитие узловых сегментов побегов разных видов березы на этапе мультипликации. Выявлено негативное воздействие на культуру тканей березы концентраций в питательной среде гентамицина 100 и 300 мг $л^{-1}$ и стрептомицина 500 и 1000 мг $л^{-1}$. На этапе мультипликации побегов оптимально периодическое применение цефотаксима в сочетании с карбенициллином в концентрациях 500–750 мг $л^{-1}$. Такой режим культивирования позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей березы в течение длительного периода времени, без негативного воздействия на морфологические параметры микрорастений.

Микрорастения березы, стерильные культуры, бактериальная контаминация, антибиотики.

При работе с культурой тканей растений происходит инфицирование пассируемого клонального материала микроорганизмами, что легко прослеживается визуально без привлечения специальных методов [8]. Контаминация клеточных культур возникает либо из внутренних тканей первичного экспланта, либо является обычно атрибутом недостаточной стерилизации материала или неправильных приемов работы, либо вводится случайным образом во время манипуляций в лаборатории [15]. Установлено, что может происходить трансмиссия патогенов человека растительным тканям [19].

Искоренить инфекцию у первичной культуры достаточно трудно. С усилением воздействия стерилизующих агентов на инфицированный материал возрастает вероятность полной гибели эксплантов растений в результате некроза. Даже при использовании в качестве первичного экспланта меристем нельзя гарантировать избавление тканей от всех микроорганизмов [6]. Дальнейшее же культивирование таких тканей на питательных средах стимулирует накопление микроорганизмов во внутренних межклеточных полостях, что в итоге приводит к проявлению инфекции спустя *n*-число пассажей.

Многолетние древесные растения характеризуются накоплением в своих тканях в процессе роста и развития различных микроорганизмов, прежде всего бактерий, фитоплазмид, грибов, вирусов [14]. Такая особенность многолетних растений существенно затрудняет работу исследователей на этапе получения стерильной культуры [7]. В практике микроклонального размножения антибиотики редко применяются для поверхностной стерилизации растительного материала [24], но необходимы в тех случаях, когда инфицирование культуры связано с наличием спор грибов или бактерий во внутренних полостях тканей. Для подавления такой внутренней инфекции часто в питательную среду вводят различные антибиотики [12]. При этом они оказывают влияние также на рост растительной ткани. Антибиотики могут стимулировать либо, наоборот, ингибировать рост и развитие микрорастений в результате своего токсичного действия [1, 11, 18].

Проблема инфицированности клеточной культуры растений микроорганизмами является постоянной [10]. Практически каждый исследователь вынужден искать свои пути решения данной проблемы. Предложена следующая оптимальная стратегия проведения биотехнологических исследований: максимальное поддержание стерильных условий работы; получение максимально стерильного, чистого материала на этапе введения в куль-

туру; сохранение асептической культуры благодаря мониторингу на наличие микроорганизмов, включая рутинное тестирование с использованием молекулярных и серологических диагностик микроорганизмов [8]. Однако выполнение вышеперечисленных условий возможно только для биотехнологических лабораторий, оснащенных современным оборудованием. Помимо этого при использовании антибиотиков на этапах получения первичной и перевиваемой растительных культур важно знать их влияние на морфогенетический и органогенный потенциал клеточного материала *in vitro* конкретного вида, сорта, клона растений. Это вызвано тем, что, по данным лабораторий фитотехнологии, США (PhytoTechnology Laboratories, USA), чувствительность культуры тканей разных видов растений к одним и тем же антибиотикам может быть различной.

При работе с культурой клеток лиственных древесных пород, в частности разных видов березы, мы используем самые разные приемы для избавления материала от заражения микроорганизмами. В данном исследовании основное внимание уделено изучению влияния некоторых антибиотиков, добавленных в питательную среду, на рост и развитие узловых сегментов побегов различных клонов березы на этапе мультипликации.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали клоны березы карельской (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.): 76, 81 и 2а1, клоны 31 и 4б березы повислой (*B. pendula* Roth.), клон ч1 березы чернокорой (*B. obscura* Kotula ex Fiek) и клон 1б березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.) из коллекции культуральных растений Института леса НАН Беларуси. Пассирование материала выполняли каждые 30 дней на свежие питательные среды, без гормонов. Использование безгормональных сред на этапе мультипликации является элементом технологии микроклонального размножения различных видов березы, разработанной в Институте леса НАН Беларуси и апробированной в течение более восьми лет [3]. В асептических условиях нарезали однопочечные сегменты побегов длиной 0.5–1.0 см. Затем экспланты помещали на среду. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей, оптимизированная для древесных (WPM) [16], pH среды перед стерилизацией доводили до 5.6–5.8. Тестировали следующие концентрации антибиотиков: цефотаксим (РУП "Борисовский завод медицинских препаратов", Беларусь) – 500 и 750 мг $л^{-1}$; карбенициллин (ЗАО "Брынцалов-А", Россия) – 500 мг $л^{-1}$; их совместную комбинацию; гентамицин (гентамицина сульфат, РУП "Белмедпрепараты", Беларусь) – 100 и 200 мг $л^{-1}$; стрептомицин (стрептомицина сульфат, ЗАО "Брынцалов-А", Россия) – 500 и 1000 мг $л^{-1}$; аугментин ("СмитКляйн Бичем Фармасьютикалз", Великобритания) – 300 мг $л^{-1}$. 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 среду WPM без органических добавок.

Часть микрорастений различных клонов березы, ранее инкубированных на безгормональной среде, однократно субкультивировали на среды, дополненные антибиотиками. Другую часть микрорастений неоднократно (не менее 4 пассажей) субкультивировали каждые 30 дней на среды, дополненные 500–750 мг $л^{-1}$ цефотаксимом.

Материал культивировали при температуре 25 ± 1°С, с фотопериодом 16 ч и освещенностью 3–4 тыс. лк. Число повторностей в каждом варианте 20–60. Оценку материала проводили спустя 30 дней. Чистоту растительного материала контролировали визуально. Определяли морфологические параметры сформировавшихся растений (высоту побегов, число листьев и корней, степень их развитости, длину корней, массу микрорастений). Статистический анализ выполнен на основе программ Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Апробированные антибиотики имеют следующие характеристики. Цефотаксим и карбенициллин относятся к фармакотерапевтической группе: пенициллин полусинтетический, аналог цефалоспорина. Цефалоспориновые антибиотики эффективны в относительно низких дозах, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот. Действуют бактерицидно, подавляя синтез клеточной стенки бактерий. Аугментин (амоксициллин + клавулановая кислота) – из четвертого поколения антибиотиков. Гентамицин – бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, из группы аминогликозидов. 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 [13, 20].

Влияние антибиотиков на развитие микрорастений

Концентрация антибиотика, мг $л^{-1}$	Высота побегов $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, см	Число корней $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, шт
Клон 76 березы карельской		
0	4.5 ± 0.30	3.5 ± 0.37
500 кн	3.6 ± 0.22*	3.6 ± 0.30
500 цм	3.5 ± 0.20*	2.8 ± 0.25
500 кн 500 цм	3.6 ± 0.18*	3.1 ± 0.23
Клон 81 березы карельской		
0	4.8 ± 0.26	2.6 ± 0.27
500 кн	3.7 ± 0.22*	1.6 ± 0.21**
500 цм	4.6 ± 0.19	2.4 ± 0.20
500 кн 500 цм	4.0 ± 0.27	2.9 ± 0.30
Клон 2а1 березы карельской		
0	2.8 ± 0.52	2.2 ± 0.50
500 кн	1.6 ± 0.25*	0.7 ± 0.35**
500 цм	1.6 ± 0.31*	1.6 ± 0.53*
500 кн 500 цм	1.3 ± 0.16*	1.2 ± 0.20*
Клон 31 березы повислой		
0	4.7 ± 0.20	2.3 ± 0.23
500 кн	4.1 ± 0.33	1.5 ± 0.21
500 цм	2.8 ± 0.29**	1.1 ± 0.11
500 кн 500 цм	3.3 ± 0.31**	1.1 ± 0.14
300 ау	4.1 ± 0.24	1.6 ± 0.11
Клон 4б березы повислой		
0	3.7 ± 0.42	1.9 ± 0.28
500 кн	2.4 ± 0.18*	1.3 ± 0.22
500 цм	3.0 ± 0.21	2.4 ± 0.22
500 кн 500 цм	2.3 ± 0.18*	1.5 ± 0.23
300 ау	3.3 ± 0.18	3.1 ± 0.22**
Клон ч1 березы чернокорой		
0	3.9 ± 0.18	2.3 ± 0.30
500 кн	3.7 ± 0.43	2.4 ± 0.23
500 цм	3.5 ± 0.19	2.8 ± 0.19
500 кн 500 цм	2.9 ± 0.15*	1.9 ± 0.23
Клон 1б березы пушистой		
0	4.7 ± 0.22	3.3 ± 0.24
500 кн	2.8 ± 0.12**	3.0 ± 0.23
500 цм	3.0 ± 0.10**	3.0 ± 0.17
500 кн 500 цм	2.3 ± 0.12**	2.4 ± 0.15*

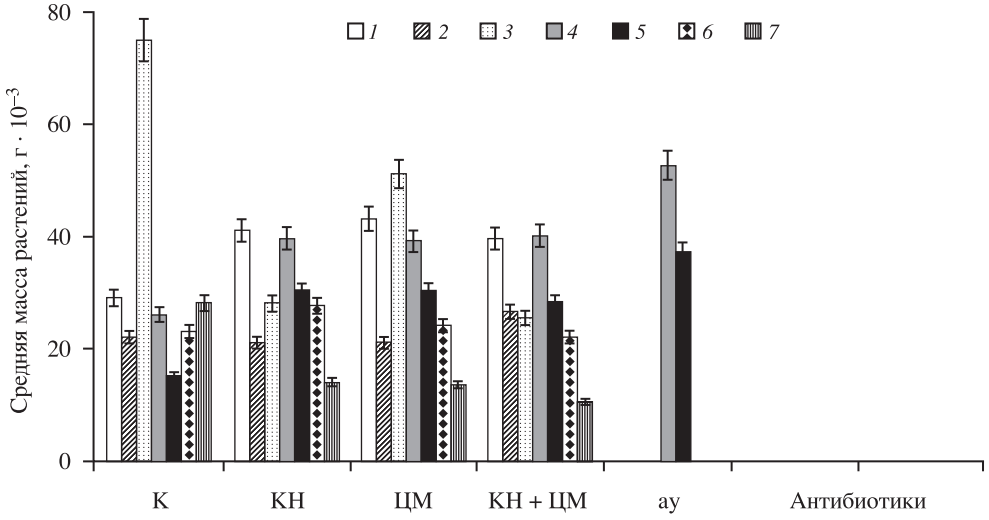
*Отличия от контроля значимы при $p < 0.05$.
**Отличия от контроля значимы при $p < 0.001$.
Примечание. Антибиотики. Кн – карбенициллин, цм – цефотаксим, ау – аугментин; x – среднее, $s_{\bar{x}}$ – ошибка среднего.

При культивировании однопочечных сегментов побегов березы на средах, дополненных гентамицином в концентрациях 100 или 300 мг $л^{-1}$, выявлено сильное подавление роста и развития эксплантов. У большинства изученных клонов отмечали их некроз в 50–100%. Выжившие экспланты характеризовались отсутствием роста побегов либо минимальным ростом, выявленным для клона 81 березы карельской. Имеющиеся листья у первичного экспланта теряли зеленую окраску, частично обесцвечивались либо желтели, реже опадали. Индукция корней отсутствовала у всех изученных клонов березы. Был установлен однозначный негативный эффект апробированных концентраций гентамицина на морфогенный статус узловых сегментов побегов березы. При использовании в составе питательной среды 500 мг $л^{-1}$ стрептомицина был очень слабый рост 30% эксплантов клона 81 березы карельской, а остальные не развились и некротизировали. Наблюдали появление в толще питательной среды слабо развитой бактериальной инфекции у оснований узловых сегментов побегов. Увеличение концентрации стрептомицина до 1000 мг $л^{-1}$ в культуральной среде, подавляя рост бактерий, способствовало быстрому некрозу всех эксплантов.

В данном эксперименте применение антибиотиков в составе питательных сред было разовым, в череде многократных пассирований материала на безгормональные среды. При использовании цефотаксима, карбенициллина и их совместной комбинации не выявлено активное подавление процессов роста и развития эксплантов (таблица). Во всех вариантах опыта наблюдали рост однопочечных сегментов побегов в высоту, формирование зеленых листьев, стабильное корнеобразование. Эффективность регенерации растений зависела в первую очередь от генотипа. Для всех изученных клонов березы отмечали либо достоверное снижение морфометрических параметров растений, либо полученные значения в опытных вариантах были сопоставимы со значением в контроле (таблица). В большей мере цефалоспориновые антибиотики повлияли на среднюю высоту побегов и на параметры ризогенеза.

Средняя масса микрорастений у большинства из изученных клонов березы возрастала на опытных средах в 1.5 раза. У клона ч1 березы чернокорой масса растений практически не менялась. У клонов 2а1 березы карельской и клона 1б березы пушистой средняя масса растений на средах, дополненных цефалоспориновыми антибиотиками, снизилась по сравнению с контролем более чем в 2 раза (рисунок).

Клоны березы повислой (31 и 4б) культивировали на средах, дополненных 300 мг $л^{-1}$ аугментином. Выявлено стимулирующее действие данного антибиотика на развитие эксплантов. Хотя значения морфометрических параметров микро-



Влияние антибиотиков на среднюю массу микрорастений березы: к – контроль (безгормональная среда), кн – карбенициллин, цм – цефотаксим, кн + цм – карбенициллин + цефотаксим, ау – аугментин, *1* – клон 76, *2* – клон 81, *3* – клон 2а1, *4* – клон 31, *5* – клон 4б, *6* – клон ч1, *7* – клон 1б.

растений были на уровне контроля, почти в 2 раза возрастала масса микрорастений (рисунок).

При последующем субкультивировании растительного материала на безгормональные среды визуально оценена эффективность использования антибиотиков для получения чистого материала (избавления от бактериальной инфекции). В нашем случае наилучшие результаты показало применение карбенициллина либо его совместное действие с цефотаксимом. Появление бактериальной инфекции наблюдали спустя 6–9 пассажей. При внесении только цефотаксима в состав среды инфекция появлялась через 1–3 пассажа. После пассирования материала со среды с аугментином на безгормональную уже в первом же пассаже наблюдали значительную бактериальную инфекцию на поверхности среды.

В дальнейшем мы также исследовали эффект цефотаксима в концентрации 750 мг $л^{-1}$ на рост и развитие узловых сегментов побегов березы. Не выявлено негативное влияние апробированной концентрации антибиотика на морфологические параметры микрорастений. Однако отсутствовало и токсичное действие на бактерии, содержащиеся в полостях тканей растений. Период сохранения визуально чистой культуры остался на уровне 1–3 месяцев.

Часть растений в течение 4–6 пассажей субкультивировали только на среды, дополненные цефотаксимом в концентрации 500 или 750 мг $л^{-1}$. Чаще всего с каждым пассажем отмечали тенденцию снижения основных морфологических параметров сформировавшихся микрорастений. При таком режиме культивирования установлена неоднозначная реакция генотипов. Клоны березы пушистой, березы повислой и березы чернокорой характеризовались подавлением ростовых характеристик в незначительной степени. Реакция же растений клонов 2а1 и 81 березы карельской на средах с антибиотиками была непредсказуемой. В одном пассаже могли наблюдать стимулирование роста эксплантов, формирование мощных растений с сильной корневой системой, в другом пассаже – отмечать индукцию каллуса вместо корней, отсутствие роста и даже некроз эксплантов. Следует подчеркнуть, что вышеизложенные экспериментальные данные являются усредненными и довольно типичными для культуры тканей березы. В своей многолетней практике мы неоднократно получали аналогичные результаты при периодическом использовании антибиотиков на этапе мультипликации. Для избавления от внутренней инфекции растительной культуры мы применяли и другие приемы и способы работы. Однако не удалось получить культуры клонов, которые могли бы сохранять чистоту от микроорганизмов на протяжении длительного периода времени. Так, периодическая стерилизация эксплантов дезинфицирующими агентами на практике имела почти нулевой эффект, поскольку при субкультивировании отбраковывалось большое количество материала, а инфекция спустя 2–6 месяцев вновь появлялась. По нашему мнению, использование антибиотиков или других химических веществ, обладающих антибактериальным эффектом [17], при работе с тканевой растительной культурой является обязательным условием.

Другое дело, что следует учитывать как можно больше функций воздействия данного класса веществ, их токсичность на определенные виды микроорганизмов и токсичность на растительные ткани.

Исследования по воздействию антибиотиков на клеточные культуры различных сельскохозяйственных растений довольно многочисленны и активно проводятся многие десятилетия. Так, на подсолнечнике выявлено, что в слабых концентрациях некоторые из них значительно стимулируют рост нормальной ткани, а при повышенной концентрации вызывают его угнетение [18]. На культуре *in vitro Nicotiana tabacum* показано, что часто концентрации антибиотиков, угнетающие рост ткани или вызывающие нарушения межклеточного и клеточного обмена, бывают недостаточными для подавления развития инфекционных микроорганизмов [1]. 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 [11].

Имеются сведения о влиянии антибиотиков на клеточном и молекулярном уровнях. Установлен эффект пенициллинов на активность ферментов азотного метаболизма, изменение ульстраструктурных элементов клетки и биохимических процессов, имевшие место в стабилизированной культуре каллуса, полученного из мезофилла листа *Sedum telephium* L. [21, 22]. В культуре тканей растений пшеницы, произрастающих на средах, дополненных разными формами пенициллинов, отмечено усиление многих метаболических процессов. Также установлено, что бензилпенициллин и цефотаксим индуцируют мутации за счет повреждения хромосом и митотического аппарата [5]. На крестоцветных растениях в результате обработки антибиотиками получена стабильная хлорофиллдефектность [2].

При использовании антибиотиков на этапе микроразмножения лесных древесных растений показано, что отдельный антибиотик не эффективен против эндогенной бактериальной инфекции [25]. 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 [9]. Комбинация нескольких антибиотиков намного эффективнее. Тем не менее сохраняется риск увеличения сомаклональной изменчивости в результате использования антибиотиков [23].

Как было экспериментально установлено, каждый изученный клон березы имеет свою устойчивость к апробированным антибиотикам. Наиболее нестабильными к воздействию антибиотиков оказались микрорастения клонов березы карельской. Возможно, вариабельность морфологических параметров и морфогенетической активности культуры тканей вызвана природными особенностями данной разновидности березы. О.С. Машкина и Ю.Н. Исаков [4] отметили гетерогенность у березы карельской на молекулярном (в частности, в гормональном статусе), хромосомном, клеточном, гистологическом, организменном уровнях. По-видимому, эта исходная гетерогенность не только реализуется в процессе культивирования, но может варьировать в результате клеточной селекции, что выражается в появлении новых фенотипических либо наследственных качеств под воздействием модифицирующего или мутационного характера условий культивирования, и различных компонентов питательной среды. Из вышесказанного следует, что при работе с культурой тканей березы карельской необходимо контролировать применение антибиотиков.

Выводы. 1. Выявлено негативное воздействие присутствия в питательной среде гентамицина в концентрациях 100 и 300 мг $л^{-1}$ и стрептомицина в концентрациях 500 и 1000 мг $л^{-1}$ на культуру тканей различных видов березы.

2. На этапе мультипликации побегов березы оптимальным является применение цефотаксима в сочетании с карбенициллином, в концентрациях по 500 мг $л^{-1}$. Такой режим позволяет поддерживать визуально чистую культуру тканей в течение длительного периода времени, без негативного воздействия на морфометрические параметры микрорастений.

3. При размножении клонов различных видов березы, в первую очередь березы карельской, необходимо проводить регулярное тестирование по морфологическим, а при необходимости цитогенетическим, биохимическим или молекулярно-генетическим показателям выборочных экземпляров отдельных микроклонов, культивированных *in vitro*.

4. При работе с культурой клеток и тканей березы следует придерживаться концепции совместного использования нескольких видов анти-

биотиков либо чередовать их применение. Не рекомендуется использовать антибиотики в каждом пассаже при рутинном размножении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

2. *Зубко М.К.* Стабильная хлорофиллдефектность, индуцированная у крестоцветных растений с помощью антибиотиков // Физиология и биохимия культурных растений. 1999. Т. 31. № 6. С. 467–473.

3. *Концевая И.И., Падутов В.Е., Шестибратов К.А.* Перспективы использования биотехнологии в лесном хозяйстве // Лесное и охотничье хозяйство. 2007. № 7. С. 26–28.

4. *Машкина О.С., Исаков Ю.Н.* Использование методов биотехнологии в лесной генетике, селекции и сохранении генофонда // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений. Гомель: Ин-т леса НАНБ, 2003. Вып. 59. С. 149–153.

5. *Редикин Ю.В., Пеньевская Н.А., Гурова О.П., Нахаева В.И., Щербакова О.В., Горбачевский И.В.* Цитогенотоксические эффекты бета-лактамных антибиотиков. Сообщение 1. Тест на индукцию повреждения митотических хромосом в клетках корневой меристемы пшеницы // Уч. зап. биол. фак. Омск: Изд-во ОмГПУ, 1996. № 5. С. 77–92.

6. *Boxus P., Quoirin M., Laine J.M.* Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture // Plant Cell Tissue and Organ Culture. Berlin: Springer-Verlag, 1977. P. 130–135.

7. *Cassells A.C.* Problems in tissue culture: culture contamination // Micropropagation technology and application. Dordecht: Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1990. 120 p.

8. *Cassells A.C.* Pathogen and microbial contamination management in micropropagation – an overview // Pathogen and microbial contamination management in micropropagation / Ed. Cassells A.C. Dordecht: Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1997. P. 1–14.

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

10. *Enjalric F., Carron M.P., Lardet L.* Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis* // Bacterial and bacteria-like contaminationts of plant tissue cultures. Acta Horticulturae (ISHS). 1988. V. 225. P. 57–65.

11. *Gilbert J.E., Shohet S., Caligari D.S.* The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures // Ann. Appl. Biol. 1991. V. 119. № 1. P. 113–120.

12. *Hennig F., Hänsch K.T.* Untersuchungen zur in vitro-Verklonung von systematisch bakteriell verseuchtem Pflanzenmaterial // Akad. Landwirtschaffswiss. DDR. 1989. № 281. P. 153–159.

13. *Ieamkhang S., Chatchawankanpanich O.* Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2005. V. 82. № 2. P. 213–220.

14. *Leifert C., Cassells A.C.* Microbial hazards in plant tissue and cell cultures // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2001.V. 37. P. 133–138.

15. *Leifert C., Morris C.E., Waites W.M.* Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-growtn plants: reasons for contamination problems in vitro // Crit. Rev. Plant Sci. 1994. V. 13. P. 139–182.

16. *Lloyd G., McCown B.* Commercially feasible micropropagation of mountain laured, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 1980. № 30. P. 421–427.

17. *Macek T., Vanek T., Maskova M.* Diethylpyrocarbonate – an effective agent for the sterilization of different types of nutrient media // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. V. 43. № 2. P. 185–190.

18. *Nickell L.G.* Stimulation of plant growth by antibiotics // Proc. Soc. Exptl Biol. 1952. V. 80. P. 615–617.

19. *Odutayo O.I., Amusa N.A., Okutade O.O., Ogunsanwo Y.R.* Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria // African J. Agr. Res. 2007. V. 2 (№ 3). P. 67–72.

20. *Okkels F.T., Pedersen M.G.* The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics // Acta Hortic. 1988. V. 225. P. 199–207.

21. *Santos I., Salema R.* Effects of penicillins on plant tissue cultures: ultrastructural and biochemical aspects // Boletim da Sociedade Broteriana. Coimbra. Portugal: Institute Botnico da Universidade de Coimbra. 1985. V. 58. P. 269–285.

22. *Santos I., Salema R.* Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue cultures // Plant. Sci. 1989. V. 59. № 1. P. 119–125.

23. *Scowcroft W.R., Brettell R., Ryan S.A., Davies P.A., Pallotta M.A.* Somaclonal variation and genomic flux // Plant Tissue and Cell Culture / Eds. Green, et al. Alan A. R. Liss. N.Y. V. 3. P. 275–286.

24. *Ummey H., Sharmin R., Mihir Lai S., Khan M.R., Hadiuzzaman S.* Endogenous bacterial contamination in vitro of table banana: identification and prevention // Plant Tissue Cult. 2002. V. 12 (№ 2). P. 117–124.

25. *Young P.M., Hutchins A.S., Canfield M.L.* Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of woody plants // Plant Sci. Lett. 1984. V. 34. P. 203–209.

The Use of Antibiotics in Birch Tissue Culture

I. I. Kontsevaya

The influence of carbenicillin, cefotaxime, gentamycin, streptomycin, and augmentin added to nutrition medium on the growth and development of nodal segments in shoots of different birch species at the stage of multiplication was studied. The application of gentamycin and streptomycin at concentrations of 100–300 and 500–1000 mg l^{-1}, respectively, was shown to affect negatively the culture of birch tissues. At the shoot multiplication stage, the periodic application of cefotaxime in combination with carbenicillin at 500–750 mg l^{-1} was optimal. This schedule of cultivation permits to visually sustain the sterile culture of birch tissues for a long time without adverse responses of the antibiotics to the morphological parameters of microplants.