

И.И. Концевая, Л.Н. Усачева

ЭФФЕКТ ЦИТОКИНИНОВ И ЦЕФОТАКСИМА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЖДОУЗЛИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ БЕРЕЗЫ КАРЕЛЬСКОЙ

Исследовали влияние цитокининов (бензиламинопурина, зеатина, тидиазурона) и антибиотика цефотаксима, добавленных в питательную среду, на регенерационную активность междоузлий двух клонов *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. Выявлено варьирование частоты индукции побегообразования у междоузлий клонов 76 и 81 березы карельской; установлена более высокая органогенная способность междоузлий клона 76. Определена оптимальная концентрация тидиазурона в питательной среде, стимулирующая морфогенез *in vitro* в культуре тканей: 0,005...0,05 мг/л. Введение в среду бензиламинопурина (2,0 мг/л) и зеатина (5,0 мг/л) также способствовало повышению пролиферирующей активности у адвентивных почек и побегов на междоузлиях обоих клонов. Эффект стимулирования регенерационной активности соматических тканей березы карельской существенно повышался при добавлении в среду, кроме цитокининов, антибиотика цефотаксима (500 мг/л).

Введение

В последнее десятилетие биотехнологические методы широко используются во многих развитых странах в программах по селекции древесных лесных растений, в том числе и березы.

Наиболее активно проводятся исследования по культуре ткани у *Betula pendula* и ее редкой генетической разновидности – березы карельской (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.) [1–7], которая представляет особый интерес для деревообрабатывающей промышленности [8]. Ее древесина из-за своей узорчатости является очень ценной, особенно в странах Северной и Центральной Европы. Беларусь относится к странам с богатым естественным генетическим потенциалом и значительными ресурсами карельской березы. Однако в результате антропогенных и природных воздействий насаждения карельской березы с каждым годом уменьшаются [9]. В то же время, имеются сложности искусственного размножения березы карельской: воспроизводство узорчатых форм в силу биологических особенностей породы не возможно с помощью семенного размножения, черенки не укореняются. Для эффективного сохранения и массового воспроизводства ценных форм различных видов берез, прежде всего карельской, необходимо развивать и внедрять в производство метод микроклонального размножения, что, однако, невозможно без знаний о морфогенезе *in vitro* конкретных видов и клонов березы.

Большинство разработок по клональному размножению некоторых видов березы выполнено с использованием целых листьев или их сегментов в качестве эксплантов [2; 3; 5–7]. Основное внимание исследователями было уделено оптимизации гормонального состава среды для повышения побегообразующей способности листьев. При этом отмечено преимущество использования в качестве регуляторов роста цитокининовой природы гормонов 6-бензиламинопурина [5; 6; 10] или зеатина [2; 3; 11; 12], установлены их оптимальные концентрации для определенных видов древесных растений. Только в последнее десятилетие в работах по агробактериальной трансформации березы повислой стали активно использовать в качестве цитокинина тидиазурон (1-phenol-3-(1, 2, 3-Thiadiazol-5-YL) UREA) [11; 12]. Тидиазурон нельзя безоговорочно относить к цитокининам. Это производное фенилмочевины было синтезировано в качестве дефолианта хлопчатника. Его цитокининовую активность обнаружили на каллусе у *Phaseolus* [13] и позже доказали в ряде биотестов [14].

В связи со значительной контаминацией эпифитными и эндофитными микроорганизмами тканей древесных растений, а также в опытах по генетической трансформации широко используются антибиотики. Получаемый положительный

бактериостатический и бактериоцидный эффект может служить основанием для активного внедрения применения антибиотиков на разных этапах работы с культурой *in vitro*. Особый интерес в этом отношении представляют антибиотики группы цефалоспоринов, которые эффективны в относительно низких дозах, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот. Цефалоспорины обладают бактериоцидным действием, подавляя синтез клеточной стенки бактерий; высокоактивны в отношении многих грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, устойчивых к другим антибиотикам. Два из них, карбенициллин и цефотаксим, оказывают неоднозначное действие на морфогенетические процессы у разных растений [15–17], в том числе березы [6; 10; 18; 19].

Использование отрезков междоузлий в качестве эксплантов отмечено в единичных работах по березе [1; 4; 20]. В то же время, вовлечение междоузлий в процесс микроклонального размножения позволит существенно увеличить выход растений-регенерантов.

Целью наших исследований являлась оценка пролиферирующей и регенерационной способности отрезков междоузлий разных клонов березы карельской в зависимости от присутствия в составе питательной среды цитокининов и антибиотика цефотаксима.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования явились клоны 76 и 81 березы карельской (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.). Изученные клоны различаются по происхождению и способу получения. Клон 81 введен в культуру тканей с использованием вегетативных почек, вычлененных из побегов короткоствольной узорчатой формы 15-летнего дерева. Клон 76 получен из семени от контролируемого опыления высокоствольной узорчатой формы карельской березы. В качестве эксплантов использовали сегменты междоузлий размером 0,5...1,0 см, вычлененные у одномесячных микрорастений вышеперечисленных клонов. В асептических условиях отсекали сегменты междоузлий, которые затем помещали на среду с горизонтальной ориентацией. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей WPM [21]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге и Скуга [22].

Эксперимент проводили в 2 вариантах:

- Опыт 1 – основой являлась среда WPM с последующим добавлением цитокининов в определенных концентрациях. Испытывали следующие виды регуляторов роста растений: бензиламинопурин (БАП) – 2,0 мг/л; зеатин – 5,0 мг/л; тидиазурон (TDZ) – 0,0005...1,0 мг/л.

- Опыт 2 – основой являлась среда WPM, дополненная цефотаксимом (500 мг/л), после чего в среду вводили вышеперечисленные цитокинины в тех же концентрациях.

В качестве контроля 1 использовали модифицированную среду WPM без цитокининов. Контроль 2 отличался от контроля 1 наличием в составе среды антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л.

Кислотность среды перед стерилизацией доводили до значений pH 5,6–5,8. Стерилизацию сред проводили паром под давлением 1,1 атм в течение 20 мин. Цитокинины и антибиотик добавляли в стерильных условиях в охлажденную до 45 °С агаризованную среду, после чего осуществляли ее разлив по культуральным сосудам. Материал культивировали при температуре 25±1 °С, фотопериоде 16 часов и освещенности 2–3 тыс. лк. Число повторностей в каждом варианте составляло 15–20.

Наблюдение за состоянием и ростом культур осуществляли каждые 10 дней. Материал просматривали под микроскопом МБС–10, отмечая появление недифференцированной ткани и различных органогенных структур. Учитывали процент некротизированных эксплантов; способность эксплантов к побегообразованию, каллусообразованию, ризогенезу; количество адвентивных почек и побегов на одном экспланте.

Каллус оценивали по цвету, консистенции, а также по интенсивности роста, используя трехбалльную шкалу: 0 – рост отсутствует; 1 – плохой рост; 2 – хороший; 3 – очень хороший.

Для определения регенерационной способности экспланты вместе с полученными структурами переносили на свежую безгормональную среду, на которой культивировали при оптимальных условиях в течение трех недель. Показатели параметра «среднее число почек на экспланте» рассчитывали с учетом всей выборки. При учете результатов опыта отмечали степень развития адвентивных почек и побегов, корней.

Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием программы *Microsoft Excel*. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

В течение первых 10 дней культивирования не установлено никаких изменений на эксплантах. Спустя 20 дней отмечали в большинстве опытных вариантов увеличение размеров эксплантов и пролиферацию клеток по краям сегментов междоузлий. Формирование каллусной ткани на месте среза является, по-нашему предположению, реакцией на повреждение тканей. В дальнейшем в процессе культивирования мы наблюдали рост каллуса в зависимости от присутствующего в среде регулятора роста.

Помимо каллусогенеза на междоузлиях отмечали образование двух типов органогенных структур: адвентивных почек и побегов, а также адвентивных корней. Активность регенерационных процессов зависела как от клоновой принадлежности экспланта, так и от среды культивирования. При культивировании тестируемых эксплантов на средах с цитокининами практически не наблюдали корнеобразования либо интенсивность его была существенно снижена.

Нами и другими авторами ранее было установлено, что для активизации регенерационных процессов на эксплантах требуется их субкультивирование на свежие среды с уменьшенным содержанием концентрации регуляторов роста либо их отсутствием. Это обусловлено тем, что на средах с регуляторами роста процессы дифференциации органогенных структур и их развитие осуществляются медленнее [3; 5–7]. В данном исследовании окончательная оценка по влиянию гормонального состава питательной среды и клоновой принадлежности эксплантов на морфогенез была выполнена в конце второго пассажа, т.е. спустя 50 дней культивирования.

Результаты проведенных исследований показали, что изучаемые клоны березы карельской неодинаково реагировали на введение в среду регуляторов роста и антибиотика: клон 76 оказался более отзывчивым.

Практически все апробированные в опыте концентрации цитокининов стимулировали каллусогенез у 100 % междоузлий клона 76. Интенсивность роста каллусной ткани была оценена как «очень хорошая» при наличии в среде тидиазурона в концентрации 0,005...1,0 мг/л. Уменьшение количества TDZ до 0,0005 мг/л, так же как и присутствие в среде БАП и зеатина в исследованных концентрациях, не способствовало каллусогенезу: интенсивность образования каллусной ткани была сопоставима с контрольными образцами (таблица 1). Экспланты клона 81 характеризовались меньшей интенсивностью каллусогенеза в ответ на тестируемые концентрации цитокининов. Рост каллуса констатировали как «очень хороший» только на средах, дополненных тидиазуроном в концентрациях 0,05...1,0 мг/л.

Сравнение изучаемых клонов березы карельской по виду и цвету каллуса показало, что отличия практически отсутствуют между генотипами, однако зависят от вида и концентрации цитокининов. Так, высокие концентрации TDZ (0,5 и 1,0 мг/л) стимулировали рост каллуса, по консистенции, плотности и внешнему виду похожего на плотную вату. В остальных вариантах каллус был блестящий, гранулированный, обычно кремово-зеленого цвета.

Следует отметить, что каллус, сформировавшийся на средах с цитокининами, проявлял органогенную активность в зависимости от своей клоновой принадлежности, а

также от типа используемого регулятора роста и его концентрации. Так, у клона 76 при выращивании его на средах, содержащих тидиазурон в высоких концентрациях (0,5...1,0 мг/л), регенерация корней и почек на междоузлиях полностью отсутствовала. На остальных опытных средах экспланты проявляли способность к органогенезу, прежде всего к побегообразованию. В опытных вариантах насчитывали до 25,0–100% эксплантов с адвентивными почками. Число адвентивных почек составляло в среднем 0,2–15,1 штук на экспланте. Наиболее высокая побегообразующая способность установлена при культивировании междоузлий на средах, дополненных тидиазуоном в концентрации 0,005 или 0,0005 мг/л, БАП или зеатином. У клона 81 наблюдали более низкую активность к регенерации у культуры каллуса и тканей первичных эксплантов. На средах с тидиазуоном в концентрации 0,005...0,5 мг/л отмечали от 13,3 до 73,3% эксплантов с почками; показатели параметра «среднее число почек на экспланте, шт.» составляли 0,3–3,3.

В ходе исследования было установлено, что присутствие в питательной среде антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л в большинстве вариантов опыта не оказывало существенного действия на процесс каллусогенеза, так как интенсивность роста каллуса, месторасположение его на экспланте, плотность и окраска, процент каллусогенеза практически не отличались от таковых в вариантах опыта с цитокининами без антибиотика. При культивировании междоузлий клона 76 на безгормональной среде антибиотик индуцировал развитие каллусной культуры на месте срезов у всех эксплантов (таблица 1).

В результате анализа полученных экспериментальных данных установлено, что включение в состав питательной среды цефотаксима также практически не оказывает влияния на активность ризогенеза у сегментов междоузлий обоих клонов березы карельской. Однако, при включении цефотаксима в состав среды, содержащей 0,005 мг/л тидиазуона, у эксплантов обоих клонов произошло увеличение побегообразующей способности. Параметр «среднее число почек на экспланте, шт.» в опытах 1 и 2 у клона 76 возрос в 1,8 раза; у клона 81 – в 2,2 раза ($p < 0,001$).

Кроме того, у клона 76 отмечали позитивное влияние цефотаксима на среде с зеатином, когда показатель параметра «среднее число почек на экспланте, шт.» увеличился с 12,7 до 21,0. В то же время включение цефотаксима в среду с БАП существенно подавляло процесс формирования адвентивных почек и побегов на каллусе у междоузлий. В этом опыте, как и в предыдущем, клон 76 также характеризовался более высокой побегообразующей способностью по сравнению с клоном 81.

Таблица 1 – Влияние цитокининов и цефотаксима на морфогенез в культуре сегментов междоузлий *B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.

Концентрация регуляторов роста, мг/л	Количество эксплантов, %			Рост каллуса, баллы	Min–max число на экспланте		Среднее число почек на экспланте ($\bar{x} \pm S_x$), шт.
	с каллусом	с корнями	с почками		почек	корней	
Опыт 1							
клон 76							
Контроль 1 (среда WPM без гормонов)	35,0	0	0	1	–	–	–
TDZ, 0,0005	25,0	0	25,0	1	5–15	–	2,5±0,9*
TDZ, 0,005	100	28,6	100	3; 2	3–15	1–4	9,3±1,4***
TDZ, 0,05	100	0	26,7	3	1–3	–	0,4±0,2
TDZ, 0,5	100	0	0	3	–	–	–
TDZ, 1,0	100	0	0	3	–	–	–
Зеатин, 5,0	100	26,7	100	1; 2	8–30	3–6	12,7±1,4***
БАП, 2,0	100	5,0	100	1	7–30	1	15,1±1,6***
клон 81							
Контроль 1	0	0	0	0	–	–	–

TDZ, 0,0005	0	0	0	0	–	–	–
TDZ, 0,005	70,0	0	53,8	1	2–7	–	3,3±0,9**
TDZ, 0,05	100	0	73,3	3	1–10	–	2,8±0,7**
TDZ, 0,5	100	0	13,3	3	1–3	–	0,3±0,2
TDZ, 1,0	100	0	0	3	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	0	0	0	–	–	–
БАП, 2,0	65,0	0	0	1	–	–	–
Опыт 2							
клон 76							
Контроль 2 (среда WPM с 500 мг/л цефотаксима)	100	0	0	1	–	–	–
TDZ, 0,0005	25,0	0	20,0	1	5–30	–	3,8±1,4*
TDZ, 0,005	100	45,0	100	2	5–30	4–9	16,9±1,9***
TDZ, 0,05	100	0	25,0	3	1–2	–	0,3±0,1*
TDZ, 0,5	100	0	0	3	–	–	–
TDZ, 1,0	100	0	0	3	–	–	–
Зеатин, 5,0	100	35,0	100	2; 3	10–40	2–5	21,0±2,0***
БАП, 2,0	100	35,0	95,0	1; 2	2–10	3–5	4,7±0,5**
клон 81							
Контроль 2	0	0	0	0	–	–	–
TDZ, 0,0005	0	0	0	0	–	–	–
TDZ, 0,005	100	0	100	1	3–10	–	7,4±1,2***
TDZ, 0,05	100	0	80,0	3	1–10	–	4,2±0,7***
TDZ, 0,5	100	0	0	3	–	–	–
TDZ, 1,0	100	0	0	3	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	0	0	0	–	–	–
БАП, 2,0	35,0	0	16,7	1	3–5	–	0,7±0,3
Примечание: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001							

Представленные результаты свидетельствуют, что оба изученных клона березы карельской характеризовались довольно высокой каллусогенной активностью на средах, дополненных тестируемыми цитокининами. Выявлена межклоновая изменчивость по интенсивности роста каллуса и его морфологическим особенностям. Установлено влияние регулятора роста, в частности, тидиазурона и его концентрации в среде, на внешний вид и окраску каллусной ткани. Так, ватообразный каллус отмечали только у клона 76 березы карельской, и только на средах, с добавлением высоких концентраций этого цитокинина. Каллус с такой морфологией совсем не проявлял, либо в незначительной мере проявлял способность к регенерации почек.

Согласно литературным данным [23], рост и окраска каллусных культур березы повислой в сильной степени зависят от генотипа и незначительно изменяются в зависимости от состава среды культивирования, что не совпадает с результатами проведенных нами опытов. Это можно объяснить использованием разных видов гормонов для инициации каллусообразования: исследователи применяли ауксины, тогда как в наших опытах испытывалось действие цитокининов, в том числе тидиазурона, который стал активно применяться в исследованиях по культуре тканей относительно недавно.

Дифференциация адвентивных побегов из каллусной ткани, образовавшейся на сегментах междоузлий, и развитие индуцированных в первом пассаже адвентивных почек зависели от клоновой принадлежности, вида и концентрации цитокининов. Экспериментально установлено, что клон 76 березы карельской обладал более высокой побегообразующей способностью. Результаты исследования подтвердили выраженный стимулирующий эффект побегообразования на соматических тканях гормонов бензиламинопурина и зеатина (таблица 1). У второго клона эти цитокинины в используемых концентрациях не проявили органогенной, в частности, побегообразующей активности. Данными исследованиями также определена эффективная концентрация тидиазурона – 0,005...0,05 мг/л, положительное действие которого при концентрации 0,005 мг/л проявилось и на клоне березы карельской 81, отличающимся низкой активностью побегообразования и даже его отсутствием при наличии в среде

цитокининов, в том числе и тидиазурона в других опытных концентрациях. Это еще раз подтверждает тот факт, что питательная среда, необходимая для оптимального роста ткани *in vitro*, существенно меняется в зависимости от ее биологических особенностей и от генотипа исходного растения. Так, по данным L. Ruunänen et al. [24], из 5 плюсовых деревьев березы карельской только у клона Е-8999 было получено 44 % регенерантов из высаженных эксплантов, у клона Е-9141 – 2 %; у остальных трех клонов морфогенез отсутствовал.

В результате выполненных исследований установлена высокая регенерационная способность у сегментов междоузлий обоих изученных клонов. Это свидетельствует о том, что исследователям имеет смысл обратить большее внимание на использование междоузлий в качестве эксплантов, в частности, при культивировании древесных растений. Представленные нами результаты тождественны данным, полученным на тополе [25]. Также имеются сведения о варьировании частоты индукции побегообразования по типам эксплантов на разных клонах березы повислой [1].

Ранее было установлено положительное воздействие антибиотиков на рост культивируемых тканей и морфогенез березы [3; 6; 11]. Результаты исследований ряда авторов позволили сделать вывод о том, что подбор вида и эффективной концентрации антибиотика нужно делать для каждого генотипа растения. Так, С. Valobra et al. на листьях *B. pendula* показали, что при добавлении в регенерационную среду оптимального количества цефотаксима (47,7 мг/л) процент эксплантов с адвентивными побегами возрастал с 38 до 78 [3]. В исследованиях М. Takeshi et al. [11] для получения регенерантов на листовых дисках *B. platyphylla* var. *japonica* была использована индукционная гормональная среда, дополненная смесью антибиотиков (цефотаксим, карбенициллин, канамицин).

Нами в предыдущих работах было показано положительное влияние цефотаксима и карбенициллина в концентрации 300...500 мг/л на регенерационную способность 1–2 почечных сегментов у *B. pendula*. При этом было отмечено выживание 100% эксплантов, которые не теряли свою регенерационную способность [6]. Данными исследованиями выявлено как стимулирующее, так и подавляющее влияние цефотаксима, добавленного в индукционную регенерационную среду, на процессы каллусогенеза и органогенеза в культуре междоузлий *B. pendula* var. *carelica*. Установлено увеличение в 2–4 раза параметра «среднее число почек на экспланте, шт.» на средах с зеатином и тидиазуроном (0,0005...0,05 мг/л) при добавлении цефотаксима. В то же время на среде с БАП на эксплантах отмечали существенное подавление процесса органогенеза в присутствии данного антибиотика у клона 76, характеризующегося высокой органогенной активностью, и незначительное стимулирование этого процесса у клона 81.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено варьирование частоты индукции побегообразования у междоузлий клонов 76 и 81 березы карельской. Установлена высокая органогенная способность междоузлий клона 76 по сравнению с клоном 81. Определена оптимальная концентрация тидиазурона в питательной среде, стимулирующая морфогенез *in vitro* в культуре тканей: 0,005...0,05 мг/л. Высокая пролиферирующая активность у адвентивных почек и побегов на междоузлиях березы карельской также проявляется при введении в среду бензиламинопурина в концентрации 2,0 мг/л и зеатина – 5,0 мг/л. Добавление в среды с тидиазуроном и зеатином антибиотика цефотаксима (500 мг/л) существенно повышает эффект стимулирования регенерационной активности соматических тканей березы карельской этими цитокининами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chalupa, V. In vitro propagation of Birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) / V. Chalupa // *Biologia plantarum* (Praha). – 1981. – V. 23, № 6. – P. 472–474.

2. Симола, Л.К. Каллусные культуры и размножение березы *in vitro* / Л.К. Симола // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 102–106.
3. Valobra, C. In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* «Dalecarlica» EM 85 / C. Valobra [et al.] // Plant cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – V. 21, № 1. – P. 51–54.
4. Galoch, E. Growth and Organogenesis of Callus from Juvenile and Adult Plants of *Betula verrucosa* Ehrh. / E. Galoch, J. Czalewska // Bul. Of the Polish Academy of Sci. Biol. Sci. – 1991. – V. 39, № 3. – P. 275–280.
5. Яцына, А.А. Регенерация побегов на листьях березы / А.А. Яцына, И.И. Концевая // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2003. – Вып. 59 : Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений. – С. 258–262.
6. Концевая, И.И. Влияние антибиотика карбенициллина на процесс регенерации в культуре листьев березы / И.И. Концевая // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2005. – Вып. 63 : Проблемы лесоведения и лесоводства. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 152–153.
7. Концевая, И.И. Влияние цитокининов на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы / И.И. Концевая // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2008. – Вып. 68 : Проблемы лесоведения и лесоводства. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 205–213.
8. Барсукова, Т.Л. Культуры березы карельской – как совокупность морфологических форм / Т.Л. Барсукова // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2007. – Вып. 67 : Проблемы лесоведения и лесоводства. Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 118–124.
9. Живулькина, Е.В. Береза карельская в Беларуси: ресурсы, структура и состояние насаждений / Е. В. Живулькина [и др.] // Ботаника: исследования / Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича. – Минск : Право и экономика, 2005. – Вып. 33. – С. 135–146.
10. Концевая, И.И. Изучение морфогенеза в культуре тканей листьев *Betula obscura* Kotula ex Fiek / 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.
11. Takeshi, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *Japonica*) / M. Takeshi [et al.] // Plant Science. – 1997. – V. 127. – P. 53–60.
12. Pappinen, A. Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola* / A. Pappinen [et al.] // Plant Cell Rep. – 2002. – V. 20. – P. 1046–1051.
13. Mok, D.W.S. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-thidiazol-5-ylurea and its effects on cytokinin autonomy in callus cultures of *Phaseolus* / D.W.S. Mok [et al.] // Plant Physiol. – 1980. – V. 65 (Suppl.). – P. 24.
14. Кулаева, О.Н. Исследование цитокининовых свойств дефолианта дропп и гербицида ДРХ-4189 / О.Н. Кулаева [и др.] // Физиология растений. – 1982. – Т. 29. – Вып. 2. – С. 266–272.
15. Agrawal, D.C. Effect of Cefotaxime on the Growth of Excited Embryo-Axes of 6 Cultivars of Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) / D.C. Agrawal [et al.] // J. Plant Physiol. – 1998. – V. 152. – P. 580–582.
16. Nauerby V. Influence of the Antibiotic Timentin on Plant Regeneration Compared to Carbenicillin and Cefotaxime in Concentration Suitable for Elimination of *Agrobacterium tumefaciens* / V. Nauerby [et al.] // Plant Sci. – 1997. – V. 123. – P. 169–177.
17. Данилова, С.А. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима / С.А. Данилова, Ю.И. Долгих // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – № 4.–С. 621–625.
18. Концевая, И.И. Использование антибиотиков на этапе мультипликации микроклонального размножения *Betula obscura* Kotula ex Fiek / И.И. Концевая, Л.Н. Усачева // Вучоная запіскі Брэсцкага дзяржаўнага ўн-та імя А.С. Пушкіна: Брэст. – 2010. – Вып. 6. – Ч. 2. – С. 65–74.

19. Концевая, И.И. Использование антибиотиков в культуре тканей березы // И.И. Концевая // Лесоведение. – 2011. – № 1 – С. 45–51.
20. Lemmetyinen, J. Activity of the CaMV35S promoter in various parts of transgenic early flowering birch clones / J. Lemmetyinen [et al.] // Plant cell Reports. – 1998. – Vol. 18. – P. 243–248.
21. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – № 30. – P. 421–427.
22. 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.
23. Glock, H. Genotype – environment interaction in tissue cultures of birch / H. Glock, H.-R. Gregorius // TAG. – 1986. – V. 72, № 4. – P. 477–482.
24. Ryyänänen, L. Propagation of adult curly-birch succeeds with tissue culture / L. Ryyänänen, M. Ryyänänen // Silva fenn. – 1986. – V. 20. – № 2. – P. 139–147.
25. Jehan, H. Ontogenesis and ploidy level of plantlets regenerated from *Populus trichorarpa x deltoides* cv. Hunnegem root, leaf and stem explants / H. Jehan [et al.] // J. Plant Physiol. – 1994. – V. 144, № 4–5. – P. 576–585.

I.I. Kontsevaya, L.N. Usachova. The Effect of Cytokinins and Cefotaxime on Regeneration Activity of Curly Birch Tissue Culture

The influence of cytokinins (benzyl-aminopurine, zeatin, thidiazuron) and cefotaxime antibiotic, added to the culture media, on internodes regeneration activity of two clones of *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl. was investigated. Variation of forthputting induction frequency for internodes of *B. pendula* var. *carelica* clones 76 and 81 was found; a higher organogenic ability of clone 76 internodes was estimated. Optimal thidiazuron concentration in culture media was defined stimulating in vitro morphogenesis in tissue culture. It amounted 0.005...0.05 mg/l. Adding benzyl-aminopurine (2.0 mg/l) and zeatin (5.0 mg/l) to the media also promoted proliferous activity increase of adventitious buds and sproutings on both clones internodes. The effect of stimulation of somatic tissues of curly birch regeneration activity increased significantly while adding to the media, apart from cytokinins, cefotaxime antibiotic (500 mg/l).

Рукапіс паступіў у рэдкалегію 21.01.2011 г.