

УДК 577.182.22/24:57.085.23:581.144.4:582.632.1

Влияние бета-лактамных антибиотиков на органоогенез в культуре тканей листовых эксплантов карельской березы

И.И. КОНЦЕВАЯ

Выявлен стимулирующий эффект ряда апробированных вариантов использования в составе питательной среды β -лактамных антибиотиков (карбенициллина и цефотаксима в концентрациях 100–1000 мг/л) на побегообразование в культуре тканей листьев карельской березы. Отмечено существенное влияние ориентации листового экспланта на поверхности питательной среды на органоогенез в культуре *in vitro*. У обоих изученных генотипов карельской березы при помещении листа абаксильной стороной на среду усиливается побегообразующая способность экспланта.

Ключевые слова: культура *in vitro*, β -лактамные антибиотики, органоогенез в культуре тканей, карельская береза.

The stimulating effect of a number of proven variants of using beta-lactam antibiotics (carbenicillin and cefotaxime in concentrations of 100–1000 mg/l) on the formation of shoots of Karelian birch leaves in tissue culture was revealed. A significant effect of the orientation of the leaf explant on the surface of the nutrient medium on organogenesis *in vitro* culture was noted. In both studied genotypes of Karelian birch, when a leaf is placed on the abaxial side on the medium, the shoot-forming ability of the explant is enhanced.

Keywords: *in vitro* culture, beta-lactam antibiotics, organogenesis in tissue culture, Karelian birch.

Введение. Биотехнологические методы широко используются во многих развитых странах в программах по селекции древесных лесных растений, в том числе и березы. Наиболее активно развиваются исследования по культуре ткани у березы повислой и ее разновидности – березы карельской [1]–[7]. Применение полученных данных на практике позволяет не только ускорить селекционный процесс, но сохранить и расширить генетическое разнообразие растений. Возможность регенерации растений из листьев и листовых дисков представляет интерес с точки зрения использования их в системах генетической трансформации, получения организмов с измененной ploидностью, соматоклональных вариантов, а также для клонального размножения.

Морфогенетические процессы в культуре листовых эксплантов изучены у многих видов растений. Установлено, что регенерация побегов на листьях зависит от различных факторов, в частности, от генотипа источника исходного материала, состава гормонов в питательной среде, возраста листьев, способ их нарезания, ориентация листа на среде и другие [2], [4], [5], [8].

В виду значительной контаминации эпифитными и эндофитными бактериями тканей древесных растений возможно активное применение антибиотиков в рамках антибактериальной терапии на разных этапах работы с культурой *in vitro*. Прежде всего это β -лактамные антибиотики, группа цефалоспориновые [9]. Они эффективны в относительно низких дозах, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот. Биологический эффект β -лактамных антибиотиков различен – от бактериостатического до бактерицидного, литического [10]. Уникален механизм действия β -лактамных антибиотиков. Мишенями для них являются транспептидазы, которые завершают синтез пептидогликана клеточной стенки прокариот. Цефалоспорины 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. В частности, в руководстве по культуре клеток [11] отмечено, что цефотаксим токсичен для микроорганизмов в концентрации 90 мг/л, а в культуре тканей растений – при концентрации более 100 мг/л.

У однодольных растений описано позитивное действие цефотаксима и карбенициллина на морфогенез *in vitro*. Было отмечено стимулирование роста каллуса и усиление органогенеза в культурах ячменя и мягкой пшеницы [12], [13]. Наблюдали повышение частоты образования эмбриогенного каллуса и регенерации растений у твердой пшеницы, причем, у низкоморфогенного сорта число регенерантов увеличивалось под действием антибиотика в 17 раз [14]. Реакция двудольных растений на цефалоспориновые антибиотики была неоднозначной. Например, у яблони цефотаксим в концентрации 200 мг/л улучшал регенерацию и развитие побегов из апикальных почек, в концентрации 500 мг/л вызывал уродства у образующихся побегов, а карбенициллин в дозе 500 мг/л ингибировал побегообразование и стимулировал рост каллуса [15]. У хлопчатника цефотаксим, в зависимости от сорта, либо стимулировал, либо ингибировал развитие побегов из изолированных зародышевых осей [16]. У табака цефотаксим слабо ингибировал образование побегов из семядольных эксплантов и укоренение растений-регенерантов, полученных из листовых дисков [17]. На березе чернокорой и повислой выявлено позитивное действие карбенициллина на побегообразующую способность листовых эксплантов [8], [18].

Целью исследования явилось изучение зависимости регенерационной способности листовых эксплантов карельской березы от присутствия в индукционной регенерационной среде антибиотиков карбенициллина и цефотаксима, ориентации листа на поверхности среды, клоновой принадлежности экспланта.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования явились клоны 76 и 81 березы карельской. В качестве эксплантов использовали листья, вычлененные у одномесячных микрорастений вышеперечисленных клонов.

В асептических условиях отсекали листья, оставляя небольшой черешок длиной 1–2 мм. На листовых пластинках делали несколько насечек и затем листья помещали абаксильной (нижней) либо адаксильной (верхней) стороной на среду.

Приготовление питательной среды, ее основной состав, условия культивирования эксплантов аналогичны работе [18]. В опытных вариантах в качестве гормона применяли цитокинин 6-бензиламинопури́н (6-БАП) в концентрации 2,0 мг/л. Тестировали следующие концентрации антибиотиков: цефотаксим – 100, 250, 500, 750 (мг/л), карбенициллин – 250, 500, 750, 1000 (мг/л), в различных комбинациях. Число повторностей в каждом варианте составляло 15–20.

Каждые 10 дней материал просматривали под микроскопом МБС–10, отмечая появление недифференцированной ткани и органогенных структур. Для определения регенерационной способности экспланты вместе с полученными структурами переносили на свежую безгормональную среду, на которой культивировали при оптимальных условиях в течение 3-х недель. Среднее число адвентивных почек подсчитывали с учетом всех эксплантов. Отмечали степень развития адвентивных почек и побегов, корней. Данные подвергали статистической обработке. Для определения достоверных различий между контрольным и опытными вариантами вычисляли критерий t-Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. При культивировании листовых эксплантов формирование адвентивных органогенных структур *de novo* наблюдали как напрямую из ткани листьев, так и через стадию каллусогенеза. Аналогичные процессы при работе с березой повислой были выявлены и другими авторами [2], [4].

Спустя 10 дней культивирования на средах, содержащих 6-БАП, отмечали увеличение размеров листьев и индукцию каллуса на срезе черешка. При дальнейшем наблюдении было установлено, что процесс каллусогенеза на листьях карельской березы зависит, в первую очередь, от клоновой принадлежности эксплантов, во-вторых, от ориентации листа на питательной среде, а также зависит от присутствия в среде антибиотиков.

В первом пассаже при культивировании листьев на безгормональной среде у клона 76 отсутствовали какие-либо изменения, в то время как у клона 81 отмечали интенсивный процесс некротизации тканей. Индукцию каллуса отмечали спустя 2–3 недели на всех листьях клона 76, культивированных на средах, содержащих 6-БАП, независимо от присутствия или отсутствия антибиотиков. Также каллусогенез наблюдали на эксплантах, инкубированных на средах, содержащих карбенициллин. Причем, концентрация данного антибиотика в среде и

его комбинирование или отсутствие таковой с цефотаксимом не оказывало влияние на процесс каллусогенеза. В то же время при культивировании листьев на средах, дополненных только цефотаксимом, каллусогенез не отмечали. На средах с 6-БАП рост каллуса чаще оценивали как хороший, на средах в отсутствие цитокинина рост каллуса оценивали как плохой. По консистенции каллус был плотным, формировался по всему экспланту. Каллус был блестящим, кремово-зеленого, зеленого цвета.

Листья клона 81 развивались на апробированных средах значительно хуже. При отсутствии в составе культуральной среды цитокинина листья в 60–100 % некротизировали, что, тем не менее, не предотвращало формирование каллуса в 10–100 % случаях на средах, содержащих только карбенициллин. Практически во всех вариантах опыта рост каллуса оценивали как плохой. По консистенции и окраске листовой каллус клона 81 не отличался от недифференцированной ткани, сформировавшейся у клона 76.

Помимо каллусогенеза, на листьях спустя 3–4 недели культивирования отмечали появление органогенных структур: адвентивных корней и адвентивных почек. Обычно формирование новообразований наблюдали на черешке листа и у его основания. Возможно, по той причине, что здесь самые молодые ткани, которые, как известно, обладают высоким морфогенным потенциалом.

На листьях отмечали образование корней. Корни формировались в первую очередь из ткани черешка листа. На опытных средах отмечали также формирование корней из ткани листовой пластинки или каллусной ткани. Интенсивность ризогенеза выше у листьев клона 76, чем у клона 81. Выявлено, что присутствие 6-БАП в питательной среде снижало корнеобразование со 100 % до 6,7 %. Лучше формировались корни на листьях, помещенных на среду верхней стороной. Количество корней на средах без 6-БАП достигало 6–7, в присутствии цитокинина – 2–3. Также наличие в составе среды цитокинина сдерживало рост корней в длину, которая не превышала 1,0 см.

Клон 76 также характеризуется более высокой побегообразующей способностью по сравнению с клоном 81. Уже в первом пассаже на средах с 6-БАП, независимо от присутствия антибиотиков, у клона 76 насчитывали до 3–15 почек на экспланте. Формирование адвентивных почек происходило только на каллусной ткани. У клона 81 адвентивные почки формировались только на средах с 6-БАП, дополненных цефотаксимом, независимо от концентрации антибиотика.

Окончательную оценку органогенеза в культуре листовых эксплантов выполняли спустя 50 дней культивирования. Результаты исследований сведены в таблицы 1–2.

К концу культивирования во втором пассаже было выявлено появление некротических повреждений на эксплантах. В большей мере у клона 81 по сравнению с клоном 76. Также наблюдали побурение части каллусов, что, на наш взгляд, и является одной из возможных причин снижения эффективности органогенеза. Можно предположить, что апробированный состав питательных сред не является оптимальным для изученных генотипов карельской березы. Прежде всего для клона 81, поскольку у последнего во многих вариантах, как в контрольном, так и опытных, отмечали полный некроз первичных эксплантов в 10–100 %, а также частичный некроз каллусной ткани. Также, возможно, из-за своей кариотипической нестабильности клон 81 обладает слабой природной морфогенной и регенерационной активностью и узким спектром адаптивности в условиях *in vitro*.

Во втором пассаже возрастает процесс корнеобразования. Сформировавшиеся ранее корни растут в длину, образуются новые корешки. Клон 76 по-прежнему характеризуется высоким уровнем ризогенеза (таблица 1). Об этом свидетельствует и более высокий процент ризогенеза и большее количество корней на экспланте, и большая их длина по сравнению с клоном 81. На средах, дополненных только антибиотиками, среднее число корней на экспланте варьировало от 1 до 10 у клона 76 и от 1 до 4 у клона 81, хотя длина большинства корней не превышала 0,2–1,0 см, лишь единичные корешки достигали длины 2,5 см. Ориентация листа оказывала существенное влияние на ризогенез. Более интенсивно этот процесс происходил при помещении листа верхней стороной на среду, независимо от клоновой принадлежности эксплантов (таблица 1, 2).

Таблица 1 – Влияние антибиотиков на органогенез листьев клона 76

Гормоны, антибиотики, мг/л	Число эксплантов, %				Среднее число адвентивных почек	
	с корнями		с почками			
	н ¹	в ²	н	в	н	в
—	100	100	—	—	—	—
6-БАП, 2	80	53	20	—	0,5 ± 0,29	—
цефотаксим, 100	100	100	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 100	67	53	100	87	5,8 ± 1,5*	3,7 ± 0,9***
цефотаксим, 250	100	100	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 250	87	47	92	93	7,4 ± 1,2***	3,1 ± 0,5***
цефотаксим, 500	100	87	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 500	73	60	87	87	5,6 ± 1,1***	6,3 ± 1,3***
цефотаксим, 750	93	93	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 750	60	87	80	87	5,7 ± 0,9***	4,4 ± 0,9***
карбенициллин, 250	100	100	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 250	47	60	60	—	1,3 ± 0,5*	—
карбенициллин, 500	93	93	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 500	92	47	60	20	1,7 ± 0,6**	0,4 ± 0,2
карбенициллин, 750	70	70	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 750	73	40	40	13	1,2 ± 0,4**	0,3 ± 0,1
карбенициллин, 1000	100	100	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 1000	93	60	80	47	3,7 ± 0,7***	1,0 ± 0,4*
цефотаксим 100, карбенициллин, 500	100	73	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 100 карбенициллин, 500	53	53	67	27	2,3 ± 0,6***	0,7 ± 0,4
цефотаксим, 250 карбенициллин, 500	100	93	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 250 карбенициллин, 500	60	47	60	33	1,9 ± 0,5**	0,5 ± 0,2*
цефотаксим, 500 карбенициллин, 500	87	100	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 500 карбенициллин, 500	40	27	67	40	1,7 ± 0,5**	0,9 ± 0,4*

Примечание: ¹нижней (абаксильной) стороной на среду, ²верхней (адаксильной) стороной на среду; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

В результате субкультивирования листовых эксплантов с новообразованиями на свежую безгормональную среду наблюдали активный рост и развитие адвентивных почек. Клон 76 характеризуется более интенсивным побегообразованием по сравнению с другим изученным клоном. На листьях клона 76, культивированных на средах, дополненных 6-БАП, отмечали побегообразование. Несомненно, выявлено стимулирующее влияние ряда апробированных вариантов использования антибиотиков на побегообразование. Возрастает как количество эксплантов с почками с 20 до 100 %, так и число адвентивных почек на одном экспланте с 2–3 до 5–20 (таблица 1). Использование только цефотаксима существенно усиливало побегообразование. В меньшей мере это сказалось на числе листьев с почками. В большей мере – на числе почек и побегов, которые формировались на экспланте. При оценке побегообразующей способности листьев клона 81 отмечена несколько иная реакция (таблица 2). Однозначно установлено негативное воздействие карбенициллина на побегообразование листьев. Только цефотаксим не подавлял образование адвентивных почек. У обоих генотипов наблюдали более интенсивный процесс побегообразования при помещении эксплантов нижней стороной на среду.

Таблица 2 – Влияние антибиотиков на органогенез листьев клона 81

Гормоны, антибиотики, мг/л	Число эксплантов, %				Среднее число адвентивных почек	
	с корнями		с почками			
	н ¹	в ²	н	в	н	в
-	20	33	—	—	—	—
6-БАП, 2	20	20	60	—	1,7 ± 0,6*	—
цефотаксим, 100	27	27	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 100	—	13	40	13	0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1
цефотаксим, 250	30	10	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 250	27	10	40	20	0,9 ± 0,3*	0,4 ± 0,3
цефотаксим, 500	30	30	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 500	10	13	20	20	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2
цефотаксим, 750	60	—	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 750	10	10	10	20	0,1 ± 0,09	0,3 ± 0,2
карбенициллин, 250	10	—	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 250	47	20	—	—	—	—
карбенициллин, 500	—	—	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 500	40	50	—	—	—	—
карбенициллин, 750	—	—	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 750	50	20	—	—	—	—
карбенициллин, 1000	—	—	—	—	—	—
6-БАП, 2, карбенициллин, 1000	20	50	—	—	—	—
цефотаксим 100, карбенициллин, 500	7	13	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 100 карбенициллин, 500	20	10	—	—	—	—
цефотаксим, 250 карбенициллин, 500	—	10	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 250 карбенициллин, 500	20	13	—	—	—	—
цефотаксим, 500 карбенициллин, 500	27	20	—	—	—	—
6-БАП, 2, цефотаксим, 500 карбенициллин, 500	20	40	—	—	—	—

Примечание: ¹нижней (абаксильной) стороной на среду, ²верхней (адаксильной) стороной на среду; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Влияние ориентации листа на среде и его целостности на морфогенетический потенциал было показано на каштане [19], яблоне [20], ежевике и малине [21], тополе [22]. Как предполагают, ориентация листа может оказывать воздействие на процесс поступления в эксплант определенных гормонов из среды, тем самым, в свою очередь, определяя появление новообразований. Так, при расположении листа абаксильной (нижней) стороной к среде происходит преимущественно образование почек, а при расположении адаксильной (верхней) стороной к среде, как правило, формируются корни. Это свидетельствует о поступлении различных веществ при разном расположении листьев, хотя, возможно, не последнюю роль здесь играет и полярность органогенеза. В целом, причины, вызывающие переход меристематических тканей к образованию корней или побегов, достаточно сложны и до конца не выяснены. Одной из возможных причин может являться различная гормональная регуляция этих процессов. Так, в первом случае (при расположении листовой пластинки нижней стороной к среде) в проводящую систему черешка из среды поступают цитокинины, ингибирующие корнеобразование и стимулирующие побегообразование. Во втором случае (листовая пластинка расположена верхней стороной к среде) поступление цитокининов затруднено, что способствует ризогенезу [23]. Однако, в целом, причины, влияющие на проявление морфогенетических реакций листа, достаточно сложны и до конца не выяснены.

Большинство из исследователей, работающих с дисками листьев [4] или с целыми листьями [2], помещали их на среду адаксильной (верхней) стороной на среду, либо случайным образом. На березе повислой ранее было показано, что при культивировании на свету лучшее побегообразование было при помещении целой либо поврежденной листовой пластинки адаксильной стороной к среде [5].

Положительное воздействие антибиотиков на рост культивируемых тканей и морфогенез показано на различных культурах многими исследователями [14]–[16]. Интерес к изучению такого влияния возрастает при проведении генетической трансформации. Выявлено, что для каждого генотипа растений требуется определение вида используемого антибиотика и его доза. Так, антибиотик канамицин стимулирует морфогенетические процессы у табака и моркови [17], в то же время у яблони он полностью подавляет морфогенез [20]. На березе также изучали воздействие разных типов антибиотиков в среде на процесс регенерации [4], [18]. На листьях *B. pendula* показано, что при добавлении оптимального количества цефотаксима (47,7 мг/л) в регенерационную среду, процент эксплантов с адвентивными побегами возрастал с 38 до 78 [4]. К сожалению, в указанной работе отсутствуют данные по влиянию цефотаксима на число регенерированных побегов на экспланте. На *B. platyphylla* var. *japonica* для получения регенерантов на листовых дисках использовали среду с 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК (а-нафтилуксусной кислоты), дополненную смесью антибиотиков (цефотаксим, карбенициллин, канамицин) [24]. Ранее нами показано положительное влияние цефотаксима и карбенициллина в концентрации 300–500 мг/л на регенерационную способность узловых сегментов у березы повислой. Отмечали выживаемость у 100 % эксплантов, которые сохраняли способность к регенерации [1].

Заключение. В настоящем эксперименте выявлен стимулирующий эффект ряда апробированных вариантов использования в составе питательной среды бета-лактамов антибиотиков (карбенициллина и цефотаксима в концентрациях 100–1000 мг/л) на побегообразование в культуре тканей листьев карельской березы. Отмечено существенное влияние ориентации листового экспланта на поверхности питательной среды на органогенез в культуре *in vitro*. У обоих изученных генотипов карельской березы, независимо от их морфогенной активности, при помещении листа адаксильной стороной на среду усиливается побегообразующая способность экспланта. И, наоборот, при помещении листа адаксильной стороной на среду возрастает процесс ризогенеза.

Работа выполнена в рамках ГПНИ (№ темы М19-33).

Литература

1. Chalupa, V. In vitro propagation of Birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) / V. Chalupa // Biologia Plantarum (Praha). – 1981. – Vol. 23, № 6. – P. 472–474.
2. Srivastava, P. S. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.) / P. S. Srivastava, A. Steinhauer, H. Glock // Plant Sci. – 1985. – Vol. 42. – P. 209–214.
3. Perez, C. Micropropagation of *Betula celtiberica* / C. Perez, P. Postigo // Annals of Botany. – 1989. – Vol. 64. – P. 67–69.
4. Valobra, C. In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* «Dalecarlica» EM 85 / C. Valobra, Piagnani, D.J. James // Plant cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – Vol. 21, № 1. – P. 51–54.
5. Концевая, И. И. Каллусообразование и органогенез на листовых эксплантах березы / И. И. Концевая, А. А. Яцына // Проблемы лесоведения и лесоводства. – 2000. – Вып. 51. – С. 193–201.
6. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего / сост. О. С. Машкина, Т. М. Табацкая. – Воронеж, 2005. – 29 с.
7. Табацкая, Т. М. Опыт длительного хранения коллекции ценных генотипов березы с использованием безгормональных питательных сред / Т. М. Табацкая, О. С. Машкина // Лесоведение. – 2020. – № 2. – С. 147–161.
8. Концевая, И. И. Изучение морфогенеза в культуре тканей листьев *Betula obscura* Kotula ex Fieх. / И. И. Концевая, А. А. Яцына // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб. научн. тр. – Гомель, 2005. – Вып. 64. – С. 219–227.

9. Яковлев, С. В. Краткий справочник по антимикробной химиотерапии / С. В. Яковлев, В. П. Яковлев. – М. : Медицина, 2002. – 127 с.
10. Госманов, Р. Г. Микробиология : уч. пособие / Р. Г. Госманов [и др.]. – М. : Изд-во Лань, 2019. – 496 с.
11. Cell Culture. Manual. 2011–2014 [Electronic resource]. – Access mode : <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/cell-culture-manual.pdf>. – Date of access : 08.09.2019.
12. Mathias, R. J. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell) / R. J. Mathias, L. A. Boyd // Plant Sci. – 1986. – Vol. 46. – P. 217–223.
13. Mathias, R. J. The Effect of Cefotaxime on the Growth and Regeneration of Callus From Four Varieties of Barley (*Hordeum vulgare* L.) / R. J. Mathias, C. Mukasa // Plant Cell Rep. – 1987. – Vol. 6. – P. 454–457.
14. Borrelli, G. M. Effect of Cefotaxime in Callus Culture and Plant Regeneration in Durum Wheat / G. M. Borrelli, N. Difonzo, E. Lupotto // J. Plant Physiol. – 1992. – Vol. 140. – P. 372–374.
15. Yepes, L. M. Factors that Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple, and Effect of Antibiotics in Morphogenesis / L. M. Yepes, H. S. Aldwinckle // Plant Cell. Tissue Organ Cult. – 1994. – Vol. 37. – P. 257–269.
16. Agrawal, D. C. Effect of Cefotaxime on the Growth of Excised Embryo-Axes of 6 Cultivars of Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) / D. C. Agrawal [et al.] // J. Plant Physiol. – 1998. – Vol. 152. – P. 580–582.
17. Nauerby, B. Influence of the Antibiotic Timentin on Plant Regeneration Compared to Carbenicillin and Cefotaxime in Concentration Suitable for Elimination of *Agrobacterium tumefaciens* / B. Nauerby, K. Billing, R. Wyndaele // Plant Sci. – 1997. – Vol. 123. – P. 169–177.
18. Концевая, И. И. Влияние антибиотика карбенициллина на процесс регенерации в культуре листьев березы / И. И. Концевая // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб. научн. тр. – Гомель, 2005. – Вып. 63. – С. 152–153.
19. Wojciechowski, M. K. Formation of adventitious buds on the leaves of *Aesculus hippocastanum* L. cultured in vitro / M. K. Wojciechowski, R. Mol // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1994. – Vol. 37, № 3. – P. 256–269.
20. Welander, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoot raised in vitro from mature apple trees / M. Welander // J. Plant Physiol. – 1988. – Vol. 132. – P. 97–103.
21. Высоцкий, В. А. Регенерация вегетативных органов листовыми дисками и другими эксплантатами рода *Rubus* in vitro / В. А. Высоцкий, М. Т. Упадышев // Физиология растений. – 1992. – Т. 39, вып. 3. – С. 584–591.
22. Быченко, Э. А. Каллусообразование и органоогенез в тканях листа *Populus balsamifera* L., культивируемого in vitro / Э. А. Быченко, А. Давид // Физиология растений. – 1978. – Т. 25, № 2. – С. 274–281.
23. Курсанов, А. Л. Транспорт ассимилятов в растениях / А. Л. Курсанов. – М. : Наука, 1976. – 646 с.
24. Mohri, T. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) / T. Mohri, Yu. Mukai, K. Shinohara // Plant Science. – 1997. – Vol. 127. – P. 53–60.