СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2015, том 50, № 1, с. 3-15

Обзоры, проблемы, итоги

УДК 633/635:581.4:579.64 doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.3rus

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ТКАНЯМИ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ in vitro: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ

(обзор)

С.Е. ДУНАЕВА[1], Ю.С. ОСЛЕДКИН[2]

Эффективная стерилизация растительных эксплантов и соблюдение правил антисептики не исключают присутствия в in vitro культурах так называемых скрытых (эндофитных) бактерий. Роль этих бактерий в культурах тканей мало изучена, однако ее, например, связывают с регенерационной способностью эксплантов и возможностью трансформировать культивируемые in vitro клетки животных и человека. Бактериальные штаммы, патогенные для человека, могут устойчиво сохраняться в пассируемых культурах и в растениях ex vitro. Расширение среды обитания бактерий создает экологические и генетические риски, которые определяют необходимость тщательного мониторинга эндофитных сообществ в растениях, употребляемых в пищу в сыром виде, а также при применении in vitro технологий в практическом растениеводстве и для получения продуктов питания. Идентификация бактериальных микроорганизмов, колонизирующих in vitro культуры растений, дает возможность изучать влияние бактерий на хозяина, проводить направленную химиотерапию, создавать банк данных микроорганизмов, ассоциированных с культурой растительных тканей. Наиболее распространены два метода идентификации — традиционный, более доступный, но не позволяющий выявлять некультивируемые формы (он основан на использовании культуральных и морфологических характеристик, а также химических и биохимических реакций), и молекулярно-генетический. В последнем случае с использованием метагеномной ДНК и соответствующих специфических праймеров определяют различные последовательности 16S-рРНК, имеющие как консервативные сайты, одинаковые у всех прокариотов, так и пригодные для идентификации видоспецифичные участки. Внутренние транскрибируемые спейсеры (internal transcribed spacers — ITS) преимущественно применяют для различения микроорганизмов на уровне видов и даже штаммов. Таксономический состав бактериальных эндофитов свидетельствует об их разнообразии и отсутствии специфического набора в in vitro культурах растений разной систематической принадлежности и в эксплантах, относящихся к разным органам растения. Среди идентифицированных эндофитных бактерий выявлены потенциально полезные для интактных растений, в частности *Streptomycete*, *Pantoea agglomerans* и др., а также патогенные для человека, например *Ralstonia mannitolytica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Bacillus neonatiensis*, *Salmonella* и *Nocaridia* spp. При in vitro культивировании растительных объектов длительное бессимптомное присутствие бактерий обусловлено, с одной стороны, подавлением их роста факторами, сопровождающими культивирование растительных эксплантов (pH, температура ниже оптимума для роста бактерий, активирование защитных механизмов), с другой — одновременным поддержанием жизнедеятельности бактерий за счет экссудатов, выделяемых растительным эксплантом. Быстрая пролиферация бактериальных клеток может наступить даже при небольших изменениях первоначальных условий, при увеличении концентрации растительных экссудатов и вследствие собственно in vitro культивирования как стресса в отсутствие регулирующей роли целого организма. По мере увеличения числа пассажей доля растительных культур со скрытой бактериальной контаминацией возрастает. Имеются данные, что при этом некультивируемые эндофиты могут приобретать статус культивируемых. Скрытые бактериальные контаминации способны угнетать регенерацию, микроклональное размножение, вызывать гибель культивируемых in vitro растительных объектов, служить препятствием для воспроизводимости протоколов и иметь отношение к появлению эпигенетических сомаклональных вариантов. Так, фильтраты изолятов *Acinetobacter* и *Lactobacillus plantarum*, выделенных из деградирующих каллусов, при инокуляции в экспланты или добавлении в питательную среду резко снижали регенерацию побегов, а бактерии *Mycobacterium obuense* и *M. aichiense* угнетали развитие семян в культуре in vitro. Акцентируется проблема получения гнотобиотических растительных культур (в частности, в in vitro коллекциях генетических банков растений), обусловленная сложностью выявления и элиминации бактериальных микроорганизмов.

Ключевые слова: культура тканей растений, бактериальные микроорганизмы, антибактериальная терапия.

При работе с культурой растительных тканей in vitro наличие бактериальной контаминация в значительной степени определяется качеством

стерильности (1, 2). Однако эффективная стерилизация растительных эксплантов и соблюдение правил антисептики не исключают присутствия в культурах in vitro скрытых бактерий (без визуально наблюдаемого роста и специфических симптомов) (3-5). Бактериальные микроорганизмы, естественным местом обитания которых служит воздушная среда, почва, растения и человек, детектируют и идентифицируют с помощью микробиологических, молекулярно-генетических и биохимических методов как в длительно пассируемых, так и в инициируемых in vitro растительных культурах (6-14). Скрытые бактериальные инфекции, обозначаемые многими исследователями как внутренние, или эндофитные, выявляют в культивируемых in vitro каллусах, микрорастениях, а также в различных типах эксплантов — в верхушках побегов, почках, меристемах (15-22). Бактериальные эндофиты, которые выполняют ряд функций, важных для растений, были и остаются предметом многочисленных исследований (23). В то же время роль эндофитных бактерий в культурах тканей менее изучена, однако она представляет интерес как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. В частности, бактериальные эндофиты рассматриваются в качестве ключевого фактора, определяющего регенерационную способность эксплантов наряду с генотипом и условиями культивирования (18). Их изучают как возможный перспективный источник новых компонентов для использования в практической микробиологии и медицине (24). Внимание к бактериальным эндофитам обусловлено также накоплением данных, указывающих на условность исторически сложившегося разделения микроорганизмов на фитопатогенные, патогенные для животных (человека) и непатогенные (25). Показано, что патогенные бактериальные штаммы человека могут устойчиво сохраняться в пассируемых культурах и в растениях ex vitro (14), а бактерии *Agrobacterium tumefaciens* способны трансформировать культивируемые in vitro клетки человека (26) и эмбрионы морских ежей (27). Расширение среды обитания бактерий создает экологические и генетические риски, которые определяют необходимость тщательного мониторинга эндофитных сообществ, особенно в тех растениях, которые человек употребляет в пищу в сыром виде (14, 28). Эта проблема актуальна и для культуры тканей растений, поскольку in vitro технологии находят широкое применение в практическом растениеводстве и получении продуктов питания.

Цель настоящего обзора заключалась в сборе и систематизации данных, касающихся выявления, идентификации, состава, динамики, возможной роли и элиминации скрытых бактериальных контаминаций в культуре тканей растений.

Бактериальные микроорганизмы, присутствие которых в культивируемых in vitro растительных объектах не сопровождается визуальными проявлениями и специфическими симптомами, в литературе обозначают как латентные, скрытые, эндогенные, внутренние, эндофитные, нередко используя эти термины как синонимы. Наиболее часто такие бактериальные микроорганизмы в культуре тканей растений называют латентными. В одной из работ (29) подчеркивается, что термин «латентный» заимствован из фитопатологии, где он применяется для описания бессимптомных патогенов, в то время как бактериальные микроорганизмы в культуре растительных тканей не обязательно патогенны (их влияние может быть отрицательным, положительным или отсутствовать). Автор цитируемой работы (29) наряду с другими исследователями (30, 31) считает более целесообразным использовать для указанных бактериальных микроорганизмов термин «скрытые». Скрытые бактериальные микроорганизмы многие иссле-

дователи называют эндофитами на основании их наличия в культуре растительных объектов, прошедших поверхностную стерилизацию. Мы будем употреблять термин «эндофитные бактерии» в соответствии с его применением авторами цитируемых работ.

Согласно широко используемому определению, эндофиты — это микроорганизмы, которые, не вызывая симптомов болезней, в течение части или всего жизненного цикла обитают внутри растения (32). В природе они поступают в растение через устьица, поранения, корневую систему. Существенную роль в формировании эндофитной микрофлоры играет передача микроорганизмов через семена, а также их интродукция векторными организмами — беспозвоночными или грибами (28, 32). Интродуцированные микроорганизмы могут включаться в состав микрофлоры растения в точке вхождения и(или) распространяться по всему растению (32), при этом облигатность не служит обязательным условием (33).

Эндофитные бактерии обнаружены в цитоплазме клеток, межклеточном пространстве (34) и в сосудистой системе (35) растений. В ряде работ присутствие эндофитных микроорганизмов в культивируемых in vitro растительных объектах показано с помощью световой и электронной микроскопии, в том числе с использованием метода in situ гибридизации (15, 16, 21, 36-38).

Источники бактериальной микрофлоры. Эндофитные бактерии происходят от эпифитных бактериальных ассоциаций ризосферы и фитосферы растения. Основной источник эндофитной бактериальной микрофлоры в культурах растительных тканей — экспланты исходных растений. Асептические экспланты для культуры in vitro сложно получить от растений с розеточной формой роста, древесных, многолетних (12, 38), произрастающих в сырых местах, собранных в период влажной и теплой погоды, больных растений (21, 39), а также при использовании подземных органов (корней, корневищ, клубнелуковиц) (40, 41), почек (из-за плотного и многослойного листового футляра), эпидермальных тканей, особенно с волосками на поверхности (42, 43). При стерилизации растительного материала некоторая часть бактериальных эпифитов может оставаться в недоступных для дезинфицирующих растворов местах, таких как закрытые устьица, складки поверхности корневых черенков, пространства между эпидермальными клетками (5, 9).

К источникам системной бактериальной инфекции в культуре тканей растений могут быть отнесены также рабочее место, оператор, инструменты, посуда (2, 44). Споры некоторых бактерий сохраняются при автоклавировании (36) и долго остаются жизнеспособными в этиловом спирте (37).

Методы выявления и идентификации бактерий. Для выявления и идентификации скрытых бактериальных контаминаций используют питательные среды и физиологические тесты, методы, основанные на применении фагов, профилировании жирных кислот и белков, а также типирование генотипов с помощью MALDI TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) масс-спектрометрии и молекулярно-генетических маркеров (RAPD-PCR — random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, REP-PCR — repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction, AFLP — amplified fragment length polymorphism, ARDRA — amplified ribosomal DNA restriction analysis, 16S-rRNA). Указанные приемы специфичны при мониторинге на разном таксономическом уровне. Так, большинство из них позволяет определить бактериальные микроорганизмы на уровне семейства, рода и вида, но для аттрибутирова-

ния подвидов, биоваров и штаммов предпочтительнее использовать современные биохимические и молекулярно-генетические методы (45).

Наиболее широко применяют два способа выявления и идентификации бактерий. Один из них, традиционный, основан на использовании культуральных и морфологических характеристик, а также химических и биохимических реакций (46). Он более доступен и не требует дорогостоящего оборудования, однако не позволяет выявить некультивируемые, то есть не метаболизирующие субстрат питательных сред, формы бактерий. Второй метод, молекулярно-генетический, базируется на анализе генов, кодирующих эволюционно консервативные рибосомальные РНК, поскольку эти гены присутствуют во всех бактериальных клетках и родоспецифичны для большинства микроорганизмов (23). Для идентификации секвенируют последовательности рибосомальных генов, кодирующих 23S-рРНК большой субъединицы (длина ~3000 п.н.) и 16S-рРНК малой субъединицы (~1500 п.н.), а также участки внутренних транскрибируемых спейсеров (internal transcribed spacers — ITS) (47). Часто определяют различные последовательности 16S-рРНК, имеющие как консервативные сайты, одинаковые у всех прокариотов, так и пригодные для идентификации видоспецифичные участки (48, 49). Еще более информативны последовательности рибосомальных спейсеров 16S—23S-рРНК, значительно более вариабельные по размерам и структуре по сравнению с районами самих генов. Поэтому внутренние транскрибируемые спейсеры преимущественно используют для различения микроорганизмов на уровне видов и даже штаммов (50). Для амплификации фрагментов генов 16S-рРНК и ITS регионов осуществляют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с метагеномной ДНК и соответствующими специфическими праймерами (13, 51, 52). Полученные продукты секвенируют и проводят поиск гомологичных последовательностей с помощью базы данных GenBank (53) для таксономической идентификации бактерий в исследуемом материале. В публикации А.В. Пиневича (54) упоминается о секвенировании геномов 60 видов бактерий, в то время как общее число описанных бактериальных видов составляет 5007.

Идентификация бактерий. Идентификация микроорганизмов, колонизирующих in vitro культуры растений, дает возможность изучать влияние бактерий на хозяина, проводить направленную химиотерапию, создавать банк данных по микроорганизмам, ассоциативным с культурой растительных тканей. В ранних работах для идентификации в основном применяли тесты классической микробиологии — определение способности бактериальной культуры к росту на питательных средах разного состава, окраска по Граму, морфология и цвет колоний (4, 6, 9, 10, 46). Современные методы позволяют существенно дополнить информацию о таксономическом разнообразии бактерий, ассоцированных с культурой тканей растений. База данных по таким микроорганизмам стремительно увеличивается. В таблице приведен таксономический состав бактериальных эндофитов в in vitro культурах для сравнительно ограниченной выборки исследованных растений, свидетельствующий о разнообразии форм, способных колонизировать ткани в культуре in vitro — нише, в которой условия резко отличаются от природных. При этом отмечается отсутствие специфического состава эндофитных бактерий в in vitro культурах растений разной систематической принадлежности и в эксплантах, относящихся к разным органам растения. Такой же вывод можно сделать, анализируя данные по идентификации бактерий в культурах тканей, полученные в более ранних исследованиях (4, 6, 9, 10).

Среди идентифицированных эндофитных бактерий выявлены потенциально полезные для интактных растений, в частности *Streptomycete*, *Pantoea agglomerans* и др., а также патогенные для человека, например *Ralstonia mannitolytica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Bacillus neonatiensis*, *Salmonella* и *Nocaridia* spp. (13).

Динамика экспрессии бактерий. Длительное бессимптомное присутствие бактерий в in vitro растительных культурах обеспечивается двумя противоположными процессами — ограничением роста и поддержанием жизнедеятельности этих микроорганизмов. Рост подавляется факторами, сопровождающими культивирование растительных объектов: pH (подкисление питательной среды), температура (25 °C) ниже оптимума для роста бактерий, возможное активирование механизмов, обусловливающих устойчивость растительных культур к бактериям (55). В то же время жизнеспособность бактериальных микроорганизмов в культуре растительных тканей поддерживается за счет экссудатов, выделяемых эксплантом, так как большинство бактерий, несмотря на гетеротрофный тип питания, не могут надежно существовать в отсутствие растительного материала (12, 55). В результате сохраняется некоторый невысокий титр бактерий, ассоциированных с культурой тканей растений, с чем связана бессимптомность и трудно искореняемое длительное присутствие микроорганизмов (персистентность).

Быстрая пролиферация бактериальных клеток может наступить даже при небольших изменениях первоначальных условий — вследствие повышения температуры окружающего воздуха, изменения кислотности или состава питательной среды, например в результате поступления дополнительного азота из отмирающих тканей экспланта (55, 56), а также при субкультивировании старых культур на питательной среде с высокой концентрацией цитокининов (8, 57). Размножение бактерий индуцируется увеличением концентрации экссудатов, выделяемых растительными культурами in vitro, которое, в свою очередь, может стимулироваться повышением температуры окружающей среды, увеличением плотности in vitro культур, переносом их на питательную среду для укоренения (55). В результате быстрого размножения бактериальных микроорганизмов возможно появление видимых симптомов в in vitro культурах и(или) видимого роста на среде культивирования эксплантов (3). Выход бактериальных микроорганизмов из культивируемых тканей в толщу питательной среды, как правило, сопровождается образованием в ней мутного ореола, отмеченного многими исследователями (7, 10, 11, 58, 59). В отсутствие регулирующей роли целого организма бесконтрольное размножение эндофитов в культуре тканей растений может стимулироваться собственно in vitro культивированием как фактором стресса (16).

В ряде работ показано, что по мере увеличения числа пассажей доля растительных культур с видимой бактериальной контаминацией уменьшается, со скрытой — возрастает. При этом может происходить изменение состава микроорганизмов, увеличение числа грамположительных форм и способности бактерий к культивированию (4, 13, 21). Так, в пассируемой культуре индивидуальных микрорастений банана показано существование бактериальных эндофитов, которые в первых трех пассажах были некультивируемыми и выявились только методом секвенирования гена 16S-рРНК (бактерии VBNC — viable but nonculturable). Однако в последующих пассажах (с 4-го до 18-го) в этих же микрорастениях выявились культивируемые бактерии (13, 21). Авторы цитируемых работ полагают, что по мере возрастания числа пассажей растительных культур содержащиеся в них

VBNC эндофиты могут приобретать статус культивируемых.

Влияние бактерий на колонизируемые ими растительные культуры in vitro. Бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с культурой растительных тканей, способны отрицательно влиять на регенерационную способность каллуса, клеточных суспензий и протопластов (38, 56), угнетать микроклональное размножение, рост и укоренение побегов, вызывать гибель культивируемых in vitro и ex vitro растительных объектов (3, 11, 13, 21, 29, 36, 37, 57, 60). Скрытые бактериальные контаминации в растительных культурах могут служить препятствием для воспроизводимости протоколов (29) и иметь отношение к появлению эпигенетических сомаклональных вариантов (61). Одна из вероятных причин негативного влияния скрытых бактериальных микроорганизмов — повышение их титра. Такая возможность рассматривается некоторыми авторами в связи с гибелью растительных культур после 2-го или 3-го субкультивирования (18, 62). В своих исследованиях мы также отмечали, что 2-й и 3-й пассажи — критические для микроразмножения введенных в культуру in vitro эксплантов малины (59). Угнетающее действие бактерий на in vitro растительные объекты может быть также связано с изменением кислотности питательной среды или ее состава под влиянием бактерий (потребление сахарозы, образование гербицидных субстанций) (63).

Особый интерес представляют работы по изучению влияния аксенических бактериальных культур на in vitro растительные объекты. Показано, что фильтраты культур *Acinetobacter* и *Lactobacillus plantarum*, выделенных из деградирующих каллусов растений, при инокулировании в растительные экспланты или добавлении в питательную среду резко снижали регенерацию побегов у каллусов (56, 63). Бактерии *Mycobacterium obuense* и *M. aichiense* угнетали развитие семян в культуре in vitro (38).

Полезную роль эндофитных микроорганизмов в in vitro культурах растений начали исследовать позднее, и эти данные менее многочисленны. В ряде работ отмечен позитивный эффект бактерий рода *Methylobacterium* на индукцию органогенеза и эмбриогенеза (15, 17, 64-68). Предполагается, что выявленные методом in situ гибридизации в культуре тканей сосны эндофиты *Mycobacterium* sp., *Methylobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodotorula minuta* могут иметь положительное влияние на морфогенез в культуре in vitro (17) по аналогии с действием бактерий на развивающиеся ткани животных (69). Показано стимулирующее влияние *Bacillus circulans* на соматический морфогенез у герани (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey) (70).

Таким образом, бактериальные микроорганизмы, ассоциированные с тканями растений в культуре in vitro, могут оказывать на них как позитивные воздействия, так и играть роль факторов, лимитирующих рост и жизнедеятельность.

В генетических банках растений основное требование к in vitro и криоколлекциям растений заключается в отсутствии внутренней микрофлоры. Гнотобиотический статус сертифицированного растительного материала позволяет избежать переноса скрытых инфекций при использовании технологий микроразмножения и служит критерием надежного сохранения генотипов в контролируемых условиях среды. Для сертификации растительного материала в нем проводят выявление, идентификацию и элиминацию основных вирусов, микоплазм и всей бактериальной микрофлоры (39). Разнообразие, многочисленность и динамическое состояние бактерий в in vitro растительных культурах создают необходимость периодического тестирования растительного материала на присутствие бактерий

Эндофитные бактерии, выявленные в in vitro культуре тканей растений

Род, вид (сорт растения)	Тип культур (продолжительность культивирования in vitro)	Род, вид бактерий (частота обнаружения, %)	Ссылка
Chrysanthemum (Arka Swarna)	Микрорастения (1-7 пассажей)	Различные морфотипы *Curtobacterium citreum*	(8)
Pinus sylvestris	Каллусная культура	*Hormonema dematioides* (isolates L, M), *Methylobacterium extorquens* (isolate F), *Pseudomonas synxantha* (isolates G, H, J), *Pseudomonas* sp. (isolates K, N), *Rhodotorula minuta* (isolate T)	(16)
Pinus sylvestris	Каллусная и суспензионная культуры	*Methylobacterium extorquens*	(18)
Prunus cerasus (Montmorency)	Микрорастения	*Pseudomonas aeruginosa*	(19)
Bactris gasipaes	Микрорастения	*Brevibacillus* sp., *Moraxella* sp.	(20)
Musa sp.	Микрорастения (длительное микроклонирование)	*Alcaligenes*, *Bacillus* spp., *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacter, Klebsiella*, *Kocuri*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Oceanobacillus*, *Ochrobactrum, Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Tetrasphaer* spp.	(21)
Musa sapientum (Chini champa)	Верхушки побегов (1-2 нед культивирования)	Грамположительные: *Bacillus megaterium*, *Cellulomona uda*, *C. flavigena*, *Corynebacterium paurometabolum* Грамотрицательные: *Erwinia cypripedii*, *Klebsiell* sp., *Pseudomonas* sp.	(22)
Larix, Picea	Суспензионная культура (6-8 нед культивирования)	*Acinetobacter*	(56)
Chrysanthemum (Arka Ravi)	Микрорастения	*Enterobacter*, *Methylobacterium* spp., *Ralstonia*	(57)
Rubus idaeus, *Fragaria ananassa*, *Cerasus vulgaris*, *Ribes nigrum*	Микрорастения из коллекции in vitro	*Arthrobacter* (23,5 %), *Bacillus* (51,5 %) Реже встречаются *Agrobacterium*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*	(58)
Jatropha curcas	Листовые экспланты	*Enterobacter ludwigii*	(62)
Fragaria ananassa (Camarosa, Sweet Charlie, Oso-Grande)	Меристема	17 бактериальных штаммов из родов *Bacillus*, *Sphingopyxis*, *Virgibacillus*	(64)
Musa sp.	Верхушки побегов	*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus* spp., *Virgibacillus*; *Actinobacteria* (*Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Kocuria* spp.); α-*proteobacteria* (*Paracoccus* sp.); Y-*proteobacteria* (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas*)	(51)
Ilex dumosa	Сегменты узлов побега	*Achromobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*	(71)
Echinacea	Микрорастения	*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Wautersia* (*Ralstonia*)	(72)
Carica papaya	Верхушки побегов	*Agrobacterium* (*A. tumefaciens*), *Bacillus* (*B. benzoevorans*), *Brevundimonas* (*B. aurantiaca*), *Enterobacter* (*E. cloacae*), *Methylobacterium* (*M. rhodesianum*), *Microbacterium* (*M. esteraromaticum*), *Pantoea* (*P. ananatis*) (70 %), *Sphingomonas*, *Wautersia* (*Ralstonia*)	(73)
Potato	Микрорастения	*Bacillus pumilus*	(74)
Carica papaya	Верхушки побегов (1 мес культивирования)	*Lysinibacillus fusiformis*, *Paenibacillus* sp., *Pantoea* sp., *Ralstonia mannitolilytica*, *Sphingomonas* sp.	(75)
Limonium simuatum	Микрорастения	*Alcaligenes* sp., *Pasteurella multocida*, *Stenotrophomonas maltophilia*	(76)
Ananas comosus	Микрорастения (5 лет культивирования)	*Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*	(77)
Piper nigrum, *Piper colubrinum*, *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, *Withania somnifera*	Каллусная культура (первичные экспланты)	*Aminobacter*, *Flavobacterium*, *Morococcus*, *Paracoccus Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Rhizobacter*	(78)

и использования разных методов для их выявления. Это представляет определенную сложность при работе с большими in vitro коллекциями в генетических банках растений.

Антибактериальная терапия. Для элиминации бактериальных микроорганизмов применяются антибиотики (79). Описание и свойства некоторых антибиотиков, применяемых для химиотерапии растений, приведены в обзоре G. Seckinger с соавт. (80). Идеальные антибиотики, рекомендуемые для элиминации бактерий в культуре растительных тканей, должны быть бактерицидными, недорогими, нетоксичными для человека, растворимыми в питательных средах и не изменять их pH (9, 61). Результативность выбора наиболее эффективных антибиотиков (с широким спектром действия или в специфической комбинации) повышается при идентификации бактерий в культивируемых in vitro растительных объектах. В случае использования комбинации антибиотиков (особенно при их синергетическом действии) снижается риск возникновения устойчивости к ним у бактерий, однако некоторые антибиотики химически несовместимы и в сочетании могут нейтрализовать действие друг друга (71, 72). Грамотрицательные бактерии (они составляют большинство среди идентифицированных в культуре растительных тканей) особенно трудно поддаются элиминации из-за фактически двойной клеточной мембраны, затрудняющей проникновение многих антибиотиков. После применения антибактериальной терапии растительный материал необходимо тестировать на присутствие бактерий на протяжении 2-3 пассажей (71).

Использование антибиотиков в культуре растительных тканей объективно осложняется различными причинами. Так, необходим подбор эффективного антибиотика в бактерицидной для конкретного бактериального организма концентрации и оценка влияния антибиотика на in vitro культивируемый растительный объект; неизбежно появление бактериальных штаммов, резистентных к применяемому антибиотику; антибиотики вызывают повреждение хлоропластов и митохондрий, что проявляется в хлорозе и морфологических изменениях эксплантов (6, 9). Успехи антибактериальной терапии в культуре тканей растений в значительной степени будут определяться развитием исследований в этой области и разработкой новых классов антибиотиков.

Итак, таксономическое разнообразие скрытой (эндофитной) бактериальной микрофлоры в in vitro растительных культурах велико и может включать формы как с отрицательным, так и с положительным влиянием на колонизируемые ими растительные объекты. По мере культивирования растительного материала может изменяться титр, состав бактериальных ассоциаций, способность к культивированию. Проблема получения гнотобиотических культур (в частности, в in vitro коллекциях генетических банков растений) связана со сложностью выявления и элиминации бактериальной микрофлоры.

Авторы выражают глубокую благодарность Т.А. Гавриленко (Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова) и В.И. Сафроновой (Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии) за ценные замечания при обсуждении материала, изложенного в статье.

[1]*ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии,*
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42,
e-mail: dunaevase@mail.ru;
[2]*ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,*
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3

Поступила в редакцию 8 октября 2013 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2015, V. 50, № 1, pp. 3-15

BACTERIAL MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE PLANT TISSUE CULTURE: IDENTIFICATION AND POSSIBLE ROLE (review)

S.E. Dunaeva[1], *Yu.S. Osledkin*[2]

[1]*N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Industry,* Russian Academy of Agricultural Sciences, 42, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail dunaevase@mail.ru;
[2]*All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology,* Russian Academy of Agricultural Sciences, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia
Received October 8, 2013 doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.3eng

Abstract

Effective sterilization of plant explants and antiseptics rules compliance do not exclude the presence of so-called covert (endophytic) bacteria in in vitro cultures. But the role of these bacteria in tissues cultures has been not enough studied whereas it was related to the explants regeneration capacity and the possibility of animal and human cells transformation under in vitro cultivation. Bacterial strains pathogenic to humans can be stably maintained in cultivated tissues and ex vitro plants. The broadening of bacterial environments creates ecological and genetic risks leading to necessity of careful monitoring of endophytic communities in plants used as raw food and at use of in vitro technologies in practical plant growing and food production. Identification of bacterial microorganisms colonizing in vitro plant cultures allows studying the bacteria effect on the host, realizing special chemotherapy and developing the microorganisms' databases. Two methods of identification are the most widespread: more available traditional one that does not allow detecting non-cultured forms (its base is the use of cultural and morphological characteristics as well as chemical and biochemical reactions) and molecular-genetic one. At the second approach different 16S-rRNA sequences are studied using metagenomic DNA and appropriate specific primers; these sequences have conserved sites identical for all prokaryotes and variable ones suitable for species specific regions identification. Internal transcribed spacers (ITS) are being mainly used to distinguish the microorganisms at the species level and even at strains one. Taxonomy of in vitro cultures' bacterial endophytes indicates to their diversity and absence of specific composition as for cultures of plants belonging to different taxa as for different plant organs explants. Among identified endophytic bacteria potentially useful for intact plants *Streptomycete*, *Pantoea agglomerans* and others were found as well as those pathogenic for humans, e.g. *Ralstonia mannitolytica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Bacillus neonatiensis, Salmonella* and *Nocaridia* spp. At in vitro plant cultivation durable symptomless bacterial presence is caused on the one hand by bacterial growth repression with factors accompanying plant explants cultivation (PH, temperature below bacterial optimum, activation of the defense mechanisms), and on the other hand by simultaneous bacteria support due to exudates secreted by plant explants. The rapid bacterial cells proliferation can begin even at small changes in initial conditions, at increase in plant exudates concentrations and per se in consequence of in vitro cultivation as a stress at the absence of whole organism regulatory role. As the number of subcultivations increases a portion of plant cultures with latent bacterial contamination increases too; no-cultured endophytes have been reported to acquire the status of cultured ones. Covert bacterial contamination could depress regeneration, micropropagation, cause death of in vitro cultivated objects, restrict the protocols repeatability and concern induction of epigenetic somaclonal variability. For instance *Acinetobacter* and *Lactobacillus plantarum* filtrates extracted from degrading calluses strongly reduced shoot regeneration at inoculation in explants or addition into a medium; bacteria *Mycobacterium obuense* and *M. aichiense* repressed seeds development in in vitro cultures. The article accents the problem of gnotobiological plant cultures (specifically in in vitro collections of plants genetic banks) development caused by difficulties in identification and elimination of bacterial microorganisms.

Keywords: plant tissue culture, bacterial microorganisms, antibacterial therapy.

REFERENCES

1. Leifert C., Woodward S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tiss. Cult.*, 1998, 52: 85-88 (doi: 1023/A:1005905604043).
2. Leifert C., Cassells A.C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2001, 37(2): 133-138 (doi: 10.1079/IVP2000129).
3. Cassells A.C. Contamination and its impact in tissue culture. *Acta Hort.*, 2001, 560: 353-359.
4. Leifert C., Waites W.M., Nicolas J.R. Bacterial contamination of micropropagated plant tissue cultures. *J. Appl. Bact.*, 1989, 67: 353-361.
5. Cassells A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: *Micropropagation technology and application*. P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (eds.). Kluwer Acad. Publish-

ers, 1991: 31-44.
6. Reed B.M., Mentzer J., Tanprasert P., Yu X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant Cell Tiss. Cult.*, 1998, 52: 67-70.
7. Thomas P. A three-step screening procedure for the detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Sci.*, 2004, 87: 67-72.
8. Panicker B., Thomas P., Janakiram T., Venugopalan R., Narayanappa S.B. Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum «Arka Swarna» and activation of endophytic bacteria. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 2007, 43(6): 614-622 (doi: 10.1007/s11627-007-9061-6).
9. Reed B.M., Tanprasert P. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture &. Biotechnology*, 1995, 1(3): 137-142.
10. Tanprasert P., Reed B.M. Detection and identification of bacterial contaminants from strawberry runner explants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 1997, 33: 221-226.
11. Burgutin A.B., Feoktistova N.V., Punina N.V., Ignatov A.N. *Tezisy dokladov IX Mezhdunarodnoi konferentsi «Biologiya kletok rastenii in vitro i biotekhnologiya»*. [Proc. IX Int. Conf. «Plant cell biology in vitro and biotechnology»]. Zvenigorod, 2008: 60-61.
12. Leifert C., Morris C., Waites W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue cultured and field grown plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994, 13: 139-183 (doi: 10.1080/713608058).
13. Thomas P., Swarna G.K., Roy P.K., Prakash P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2008, 93: 55-63 (doi: 10.1007/s11240-008-9341-9).
14. Rafferty S.M., Williams S., Falkiner F.R., Cassels A.C. Persistence in in vitro cultures of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) of human food poisoning pathogens: *Esherichia coli* and *Serratia marcescens. Proc. Int. Symp. on Meth. and Marks. for Qual. Assur. in Micropropagation*. A.C. Cassels, B.M. Doyle, R.F. Curry (eds.). Acta Hort., 2000, 530(ISHS): 145-151.
15. Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllyla R., Hohtola A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 3073-3077 (doi: 10.1128/AEM.66.7.3073-3077.2000).
16. Pirttilä A.M. Endophytes in the buds of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Doc. Thesis. Acta Univ. Ouluensis, Ser. A Sci. Rerum Nat.*, 2001, 36: 1-55.
17. Pirttilä A.M., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum*, 2004, 121: 305-312 (doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.00330.x).
18. Pirttilä A.M., Podolich O., Koskimäki J.J., Hohtola E., Hohtola A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2008, 95: 47-55 (doi: 10.1007/s11240-008-9413-x).
19. Kamoun R., Lepoivre P., Boxus P. Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus cerasus* cv. Montmorency. In: *Pathogen and microbial management in micropropagation*. A.C. Cassells (ed.). Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1997: 145-148.
20. De Almeida C.V., Andreote F.D., Yara R., Tanaka F.A.O., Azevedo J.L., De Almeida M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *Microbiol Biotech.*, 2009, 25: 1757-1764 (doi: 10.1007/s11274-009-0073).
21. Thomas P., Swarna G.K., Patil P., Rawal R.D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2008, 93: 39-54 (doi: 10.1007/s112-40-008-9340-x).
22. Habiba U., Reza S., Saha M.L., Khan M.R., Hadiuzzaman S. Endogenous bacterial contamination during in vitro culture of Banana: identification and prevention. *Plant Tiss. Cult.*, 2002, 12: 117-124.
23. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D., Dowling D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 278(1): 1-9.
24. Saens E., Borda C., Renata L., Da Silva M.G., Padilla G. Searching for new antibiotics in endophytic microorganisms. *Proc. 2nd Int. Symp. on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*. Orlando, FL, USA, 2008: 71 (doi: 10.11 11/j.1574-6982.2007.00918.x).
25. Markova Yu.A., Romanenko A.S., Dukhanina A.V. *Mikrobiologiya*, 2005, 74(5): 663-666.
26. Lacroix B., Tzfira T., Vainstein A., Citovsky V. A sase of promiscuity: Agrobacterium's endless hunt for new partners. *Trends Genet.*, 2006, 22: 29-37 (doi: 10.1016/j.tig.2005.10.004).
27. Bulgakov V.P., Kiselev K.V., Yakovlev K.V., Zhuravlev Y.N., Gontcharov A.A., Odintsova N.A. Agrobacterium-mediated transformation of sea urchin embryos. *Biotechnol. J.*, 2006, 1: 454-461 (doi: 10.1002/biot.200500045).

28. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 3: 3-9.
29. Thomas P. In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2004, 77: 173-179 (doi: 10.1023/B:TICU.0000016824.09108.c8.23).
30. Holland M.A., Polacco J.C. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1994, 45: 197-209 (doi: 10.1146/annurev.pp.45.060194.001213).
31. Horsch R.B., King J. A covert contaminant of cultured plant cells: elimination of a *Hyphomicrobium* sp. from cultures of *Datura innoxia* (Mill.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1983, 2: 21-28.
32. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaftee W.F. Endophytic bacteria in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 1997, 43: 895-914.
33. Baldani J.I., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S.R., Dobereiner J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 911-922.
34. Ulrich K., Ulrich F., Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, 63: 169-180 (doi: 1111/1574-6941.2007.00419.x).
35. Van Doorn W.G., De Stigter H.C.M., De Witte Y., Boekestein A. Microorganisms at the cut surface and in xylem vessels of rose stems: a scanning electron microscope study. *J. Appl. Bact.*, 1991, 70: 34-39.
36. Thomas P. Reemergence of covert bacteria *Bacillus pumilus* and *Brevibacillus* sp. in microbe-freed grape and watermelon stocks attributable to occasional autoclaving defying residual spores from previous cycles. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2006, 87: 155-165 (doi: 10.1007/s11240-006-9150-y).
37. Thomas P. Isolation of an ethanol-tolerant endospore-forming Gram-negative *Brevibacillus* sp. as a covert contaminant in grape tissue cultures. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, 101: 764-774 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02993.x).
38. Laukkanen H., Soini H., Kontunen-Soppela S., Hohtola A., Viljanen M. A mycobacterium isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. *Tree Physiol.*, 2000, 20(13): 915-920.
39. Pence V.C., Sandoval J.A. Controlling contamination during in vitro collection. In: *In vitro collection techniques for germplasm conservation*. V.C. Penke, J.A. Sandoval, V.M. Villalobos, F. Engelmann (eds.). IPGRI Technical Bulletin (Rome, Italy), 2002, 7: 30-40.
40. Roy A., Saha P.K. Factors involved during in vitro culture of *Calamus rotang*. *J. Trop. For. Sci.*, 1997, 10: 225-232.
41. Smith R.H., Burrows J., Kurten K. Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippeastrum* sp. (*Amaryllidaceae*). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 1999, 35: 281-282.
42. Buckley P.M., De Wilde E.N., Reed B.M. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 1995, 31: 58-64.
43. Reed B.M., Buckley P.M. *Tissue Culture Contaminants Handbook*. USDA-ARS, Corvallis, OR. 1999 (Lab manual).
44. Singha S., Bissonnette G.K., Double M.L. Methods for sterilizing instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures. *Hort. Sci.*, 1987, 22: 659.
45. Stead D.E., Elphinstone J.G., Weller S., Smith N., Hennessy J. Modern methods for characterizing, identification and detecting bacteria associated with plants. *Acta Hort.*, 2000, 530: 45-57.
46. *Opredelitel' bakterii Berdzhi (perevod s angliiskogo)* /Pod red.. Dzh. Khoult, N. Krig, P. Snit, Dzh. Steil, S. Uil'yams. Tom 1. [Bergey's Manual of systematic bacteriology. J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams (eds.). V. 1]. Moscow, 1997.
47. http://www.arb-silva.de
48. Greizen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32: 335-351.
49. Wilson K.H. Detection of culture-resistant bacterial pathogens by amplification and sequencing of ribosomal DNA. *Clin. Infect. Dis.*, 1994, 18: 958-962 (doi: 10.1093/clinids/18.6.958).
50. Garcia-Martinez J., Acinas S.G., Rodrigues-Valere F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Meth.*, 1999, 36: 55-64.
51. Thomas P., Soly T.A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the affinity of endophytes to the host. *Microb. Ecol.*, 2009, 58(4): 952-964 (doi: 10.1007/s00248-009-9559-z).
52. Safronova V.I., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Pavlova E.A. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiy* [*Agricultural Biology*], 2011, 3: 61-64.
53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
54. Pinevich A.V. *Mikrobiologiya. Biologiya prokariotov* [Microbiology. Biology of prokaryotes. V. 1.]. Tom 1. St. Petersburg, 2007.

55. Leifert C. Quality assurance systems for plant cell and tissue culture: The problem of latent persistence of bacterial pathogens and *Agrobacterium*-based transformation vector systems. *Acta Hort.*, 2000, 530: 87-91.
56. Ewald D., Zaspel I., Naujoks G., Behrendt U. Endogenous bacteria in tissue cultures of conifers — appearance and action. *Acta Hort.*, 2000, 530: 137-143.
57. Thomas P., Panicker B., Janakiram T., Sathyanarayana B.N. In vitro propagation of «Arka Ravi» chrysanthemum on growth regulator-free medium harboring endophytic bacteria. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 2009, 84(6): 653-659.
58. Osledkin Yu.S., Levchuk S.S., Ogorodnikova V.F., Dunaeva S.E., Lupysheva Yu.V., Orlova S.Yu., Pazova Z.Kh., Truskinov E.V., Gavrilenko T.A. *Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Molekulyarnaya genetika, genomika i biotekhnologiya»* [Proc. Int. Conf. «Molecular genetics, genomics, and biotechnology»]. Minsk, 2004: 173-174.
59. Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. *Sokhranenie vegetativno razmnozhaemykh kul'tur v in vitro i kriokollektsiyakh. Metodicheskie ukazaniya* /Pod redaktsiei T.A. Gavrilenko [Storage of vegetatively propagated cultures in vitro and in cryocollections: a manual guide. T.A. Gavrilenko (ed.)]. St. Petersburg, 2011.
60. Cooke D.L., Waites W.M., Leifert C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue culture of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*: disease development in vivo as results of latent infection in vitro. *J. Plant Dis. Protect.*, 1992, 99: 469-481.
61. Thomas P., Prabhakara B.S., Pitchaimuthu M. Cleansing the long-term micropropagated triploid watermelon cultures from covert bacteria and field testing the plants for clonal fidelity and fertility during the 7-10 year period in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2006, 85: 317-329 (doi: 10.1007/s11240-006-9083-5).
62. Misra P., Gupta N., Toppo D.D., Pandey V., Mishra M.K., Tuli R. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2010, 100: 189-197 (doi: 10.1007/s11240-009-9636-5).
63. Leifert C., Waites W.M., Camotta H. Lactobacillus plantarum: a deleterious contaminant of plant tissue cultures. *J. Appl. Bact.*, 1989, 67: 363-370.
64. Dias A.C.F., Costa F.E.C., Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpção L.C., Araújo W.L., Azevedo J.L., Melo I.S. Isolation of micro propagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25: 189-195 (doi: 10.1007/s11274-008-9878-0).
65. Polyakov A.V., Chikrizova A.F., Kalyaeva M.A., Zakharchenko N.S., Balokhina N.V., Bur'yanov Ya.I. *Fiziologiya rastenii*, 1998, 45(4): 882-887.
66. Kalyaeva M.A., Zakharchenko N.S., Doronina N.B., Rukavtsova E.B., Ivanova E.G., Alekseeva E.E., Trotsenko Yu.A., Bur'yanov Ya.I. *Fiziologiya rastenii*, 2001, 48(4): 596-599 (doi: 10.1023/A:1016715800238).
67. Kalyaeva M.A., Doronina N.B., Ivanova E.G., Trotsenko Yu.A., Bur'yanov Ya.I. *Biotekhnologiya*, 2003, 2: 38-44.
68. Shirokikh I.G., Shupletsova O.N., Shirokikh A.A. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2007, 5: 23-25.
69. McFall-Ngai M. Unseen forces: the influence of bacteria on animal development. *Devel. Biol.*, 2002, 242: 1-14 (doi: 10.1006/dbio.2001.0522).
70. Murthy B.N.S., Vettakkorumakankav N.N., KrishnaRaj S., Odumeru J., Saxena P. Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium* × *hortorum* mediated by a bacterium. *Plant Cell Rep.*, 1999, 18: 607-613.
71. Luna C., Collavino M., Mroginski L., Sansberro P. Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2008, 95(1): 13-19.
72. Lata A.H., Li X.C., Silva B., Moraes R.M., Halda-Alija L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinacea* plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2006, 85(3): 353-359 (doi: 10.1007/s11240-006-9087-1).
73. Thomas P., Kumari S., Swarna G.K., Gowda T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. *Can. J. Microbi*ol., 2007, 3(3): 380-390 (doi: 10.1139/WO6-141).
74. Iseneger D.A., Taylor P.W.J., Mullins K., McGregor G.R., Barlus M., Holchinsoo J.F. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. *Plant Cell Rep.*, 2003, 21(8): 814-820 (doi: 10.1007/s00299-003-0583-z).
75. Thomas P., Kumari S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. *Sci. Hort.*, 2010, 124(4-1): 469-474 (doi: 10.1016/j.scienta.2010.02.013).
76. Liu T.-H., Hsu N.-W., Wu R.-Y. Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental

statice by elimination of endophytic bacteria. *In vitro Cell. Devel. Biol. Plant*, 2005, 41(4): 546-549 (doi: 10.1079/IVP2005673).
77. Abreu-Tarazi M.F., Navarrete A.A., Andreote F.D., Almeida C.V., Tsai S.M., Almeida M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated «axenic» pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26(3): 555-560 (doi: 10.1007/s11274-009-0191-3).
78. Kulkarni A.A., Kelkar S.M., Watve M.G., Krishnamurthy K.V. Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in in vitro cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana* and *Withania somnifera*. *Can. J. Microbiol.*, 2007, 53: 63-74 (doi: 10.1139/WO6-106).
79. Falkiner F.R. Antibiotics and antibiotic resistance associated witch plants, fruits and vegetables. *Acta Hort.*, 2000, 530: 83-86.
80. Seckinger G.R., Torres K.C. Physical and chemical means of controlling contamination in plant tissue culture. *Proc. World Congress on in vitro Biol.* S. Francisco, California, USA, 2004 (http://www.phytotechlab.com/pdf/SIVBMay2004.pdf).