

ЭНДОФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ПРОМОУТЕРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *in vitro* (обзор)

Л.С. САМАРИНА, В.И. МАЛЯРОВСКАЯ, Е.В. РОГОЖИНА, Л.С. МАЛЮКОВА

Размножение растений *in vitro* представляет собой развитое направление современных биотехнологий, однако для многих культур, в первую очередь древесных, до сих пор нет эффективных протоколов микроразмножения. Низкий выход стерильных эксплантов на этапе введения в культуру, низкие коэффициенты размножения и укоренения микропобегов в пассажах — основные проблемы микроразмножения сортов многолетних культур. Введение растительных эксплантов в стерильную культуру оказывает стрессовое воздействие, так как сопряжено с повреждением тканей, их обработкой агрессивными стерилизующими веществами, антибиотиками и др. Это может стать причиной внезапного возникновения вирулентных эндофитов в процессе последующего пассирования. Ассоциированные с растением микроорганизмы до недавнего времени считались проблемой в микроразмножении, вызывающей контаминацию эксплантов *in vitro*. Однако в последние годы было доказано, что колонизация эндофитами часто играет важную роль в увеличении жизнестойкости растений как в условиях *in vitro*, так и при последующем культивировании *in vivo*. Положительные результаты отмечали при применении *Beauveria bassiana* (J. Akello с соавт., 2007), *Piriformospora indica* и других представителей семейства *Sebaciniales* (P. Sharma с соавт., 2014), *Fusarium oxysporum* (A.S.Y. Ting с соавт., 2008), *Ophistoma*-подобных видов грибов (M. Mucciarelli с соавт., 2003), *Phialocephala fortinii* (M. Vohnik с соавт., 2003), *Trichoderma harzianum* и других видов рода *Trichoderma* (P. Franken с соавт., 2012). Из бактерий изучались *Acetobacter diazotrophicus* (C.O. Azlin с соавт., 2007), *Achromobacter xylosoxidans* (A. Benson с соавт., 2014), *Azospirillum brasilense* (E.E. Larraburu с соавт., 2015), *Azotobacter chroococcum* (E.E. Larraburu с соавт., 2007), *Bacillus subtilis* (M. Vestberg с соавт., 2004), *B. megaterium* (P. Trivedi с соавт., 2007), *Burkholderia phytofirmans* (E.A. Ait Barka с соавт., 2000), *B. vietnamiensis* (M. Govindarajan с соавт., 2006), *Enterobacter* sp. (M.S. Mirza с соавт., 2001), *Klebsiella varicola* (C.-Y. Wei с соавт., 2014), *Microbacterium* sp. (M. Quambusch с соавт., 2014), *Pseudomonas fluorescens* (J. Thomas с соавт., 2010) и *P. putida* (R. Lifshitz с соавт., 1987). При этом остается неясно, какой фактор служит триггером, вызывающим у эндофитов смену мутуализма на патогенез. Единственным способом контроля этого процесса пока что остается выбор оптимального времени пассирования, оптимальных условий культивирования и состава питательной среды. Таким образом, в культуре клеток и тканей растений можно сохранить мутуалистический симбиоз с выгодой для растения-хозяина и для эндофита. Исследования в этой области, проведенные для ряда древесных и травянистых культур, подтвердили высокую эффективность биотизации растительных культур *in vitro* для решения проблем размножения и укоренения. Для микроразмножения растений исследователи применяли широкий спектр микроорганизмов: арбускулярные микоризные грибы, эктомикоризные грибы, эрикоидные микоризные грибы, а также различные виды бактерий. Было показано, что бактериальные и грибные эндофиты могут стимулировать рост растений через индукцию системной устойчивости к патогенам, синтеза фитогормонов и улучшения транспорта воды и питательных веществ. При этом основными проблемами их широкого применения в микроразмножении растений остаются сложности классификации и получения чистой культуры микроорганизмов.

Ключевые слова: микроразмножение, эндофиты, питательные среды, регуляторы роста растений, фитогормоны.

Размножение растений *in vitro* — развитое направление биотехнологии, однако для многих культур, в первую очередь для сортов древесных, до сих пор не разработаны эффективные протоколы микроразмножения (1, 2). Основные причины этого заключаются в низком выходе стерильных эксплантов на этапе введения в культуру и низких коэффициентах размножения и укоренения микропобегов в пассажах. Поверхностная стерилизация эксплантов и обработки антибиотиками не освобождают ткани растений от эндофитной микрофлоры, но часто провоцируют вирулентность обитающих в них латентных микроорганизмов (3). В процессе культивирования бактерии и грибы могут проявиться в первом или, что происходит чаще, после нескольких пассажей (так называемая вторичная инфекция) (4-

6). К тому же даже при отсутствии видимых следов микроорганизмов в культуре эксплантов эффективность размножения и укоренения микропоголов многолетних растений зачастую низка (7, 8), причиной чего также может быть нарушение баланса эндофитных бактериальных сообществ (3).

Эндофитные микроорганизмы способствуют росту и развитию растения-хозяина благодаря выработке фитогормонов, улучшению транспорта воды и питательных веществ, действию механизмов биологической защиты и индуцированной системной устойчивости к фитопатогенам (9).

Метаболическая активность и характер клеточной стенки растения играют ключевую роль в колонизации растения-хозяина микроорганизмами (10). На разных стадиях колонизации врожденный иммунитет растения подавляется посредством фитогормонального сигналинга, что приводит к улучшению совместимости между эндофитом и растением (11). Согласно последним данным, растения и микроорганизмы эволюционируют совместно, и даже в условиях «стерильной» культуры тканей *in vitro*, возможно, нет ни одного растения, свободного от микроорганизмов (12, 13). Эти данные подтверждаются в многочисленных работах, в том числе в наших исследованиях, где визуально отмечалось появление микроорганизмов в асептических культурах *Pelargonium*, *Citrus* spp., *Camellia sinensis*, *Hydrangea macrophylla* и многих других многолетних видов при многократном субкультивировании (14, 15). Локализация микроорганизмов в растении-хозяине различна: они встречаются в апопласте, в межклеточных пространствах и просвете дифференцированных мертвых клеток (клетки склеренхимы и ксилемы) органов (корней, ветвей, листьев, цветков, плодов и семян), очень редко — внутри клетки (16).

Первые обзоры, посвященные применению микроорганизмов в культурах растительных тканей *in vitro*, опубликовали J. Novak (17) и M.K. Rai (18). J. Novak ввел термин «биотизация» и обобщил положительные примеры ее применения при микроразмножении растений. Во второй статье приводятся примеры микоризации культивируемых *in vitro* растений, рассматриваются проблемы поиска штаммов и получения чистой культуры, возможности применения смешанных грибных культур. В недавно опубликованном обзоре российских коллег сделан акцент на идентификацию и классификацию бактериальных микроорганизмов, их возможную роль в культуре эксплантов *in vitro* (5). После этого обзоры о положительных результатах применения бактериальных и грибных эндофитов при размножении растений *in vitro* не публиковались. Заполняя пробел, мы суммировали успехи, достигнутые в последние годы в биотизации растительных культур *in vitro* грибными и бактериальными микроорганизмами, и выделили перспективные направления исследований в этой области. Кроме того, в нашем обзоре кратко затронуты механизмы усиления роста и защитных реакций растений эндофитными микроорганизмами.

Биостимуляция и биопротекторный потенциал микроорганизмов *in vitro*. Для микроразмножения растений исследователи использовали широкий спектр микроорганизмов, грибов и бактерий. Оценивался эффект арбускулярных микоризных (19), эктомикоризных (18), эрикоидных микоризных (20) грибов. Положительные результаты отмечали при применении *Beauveria bassiana* (21), *Piriformospora indica* и другие представители семейства *Sebacinales* (22), *Fusarium oxysporum* (23), *Ophiotoma*-подобных видов грибов (24), *Phialocephala fortinii* (25), *Trichoderma harzianum* и др. видов рода *Trichoderma* (26). Метаанализ влияния грибных эндофитов корней показал, что древесные растения, как правило, реагируют на их присутствие негативно, в то время как травянистые однодольные часто от-

кликаются на инокуляцию положительно (27). Из бактерий изучались *Acetobacter diazotrophicus* (28), *Achromobacter xylosoxidans* (29), *Azospirillum brasilense* (30), *Azotobacter chroococcum* (31), *Bacillus subtilis* (32), *B. megaterium* (33), *Burkholderia phytofirmans* (34), *B. vietnamiensis* (35), *Enterobacter* sp. (36), *Klebsiella variicola* (37), *Microbacterium* sp. (38), *Pseudomonas fluorescens* (39) и *P. putida* (40). Бактериальная инокуляция приводила к увеличению свежей и сухой массы побегов и корней, высоты растений, площади листовой поверхности и массы ризомы (19, 20), улучшенному укоренению *in vitro* (число и длина корней) (30), лучшей адаптации (процент акклиматизации, внешний вид растения) (41), раннему цветению и росту числа цветков, повышению устойчивости к стрессу и иммунитету (42), кроме того, наблюдались различия в профилях метаболитов (43).

Полезное влияние микроорганизмов на рост и накопление биомассы связано с улучшением абсорбции питательных веществ тканями растения и продукцией различных вторичных метаболитов, регуляторов роста (45), хитинолитических ферментов, участвующих в защите от патогенов (46), и осмопротекторов, благодаря которым растения преодолевают абиотические стрессы (47). Ниже некоторые механизмы и примеры биостимуляции будут рассмотрены подробнее.

Рост растений может улучшаться напрямую благодаря вторичным метаболитам и фитогормонам, продуцируемым микробной клеткой эндофита. К примеру, *Streptomyces atrovirens* ASU14 использует триптофан и синтезирует индолилуксусную кислоту ИУК (22 мкг/мл) (47). Ауксиноподобную активность отмечали также у птеридовой кислоты, которую синтезирует *S. hygroscopicus* TP-A0451 — эндофит растения *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn ex Deeken (папоротник орляк обыкновенный) (48). Это вещество стимулирует удлинение корней и формирование адвентивных корней у гипокотилей фасоли *Phaseolus vulgaris*. Еще один класс соединений, вырабатываемый некоторыми эндофитами, — гиббереллины (49). Сильное ростстимулирующее влияние многих эндофитов объясняется также тем, что они могут превращать растительные экссудаты и макромолекулы в формы, усваиваемые другими ростстимулирующими микроорганизмами, что служит одним из механизмов биостимуляции роста растений (50).

Микрочеренки сосны *Pinus pinaster* Sol. и *P. sylvestris* L. укоренились более эффективно при обработке штаммами *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi (51), а спонтанный ризогенез микропобегов лиственницы *Larix eurolepis*, полученных из соматических зародышей, существенно возрастал в присутствии четырех эктомикоризных грибов, при этом увеличивалась длина и степень ветвления корней (52). В другом исследовании показано влияние *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 и индолил-3-масляной кислоты (ИМК) на рост лекарственного растения *Naravelia zeylanica* (L.) DC *in vitro*. *A. xylosoxidans* — diaзотрофная эндофитная бактерия, у которой выявлена выраженная способность усиливать поглощение NO₃⁻ корнями и снижать содержание этилена (предположительно благодаря выработке деаминаз) (53). Обработка растений этими эндофитными бактериями в сочетании с ИМК улучшала рост побегов, размноженных *in vitro*, приводила к увеличению длины и числа корней, содержания хлорофилла, азота, антиоксидантных ферментов (пероксидазы и супероксиддисмутазы) и повышала устойчивость к стрессу (уровень этилена) в сравнении с показателями в необработанном контроле. При отдельном применении бактерий и ИМК положительный эффект был существенно слабее (29). При инокуляции *in vitro* растений масличной пальмы *Elaeis guineensis* Jacq диазотрофными ризобактериями *Acetobacter diazotrophicus* и *Azospirillum brasilense* происходило

усиление роста корней и побегов за счет фиксации атмосферного азота (28). При этом *A. brasiliense* оказался более эффективным, чем *A. diazotrophicus*. Инокуляция микроразмноженных растений *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos штаммами *A. brasiliense* Cd и Az39 стимулировала укоренение *in vitro*, снижая потребность в ауксине на 49 % на половинной среде MSG (30). На этой среде штамм Cd в сочетании с ИМК (30 мкМ) индуцировал корнеобразование у 98 % побегов на 21 сут раньше, чем в контроле без инокуляции. У инокулированных побегов индекс биомассы возрос на 127 до 286 %.

Инокуляция растений эндофитными микроорганизмами положительно влияла не только на корнеобразование, но и на увеличение биомассы растений *in vitro*, коэффициент размножения и синтез биологически активных веществ. Так, было описано выделение азотфиксирующих бактерий из сахарной свеклы и их положительное воздействие на рост микроразмноженных растений (36). Два азотфиксирующих бактериальных изолята (SC11, SC20; 10^6 КОЕ/г сухой массы) получили из побегов и два (SR12, SR13; 10^7 КОЕ/г сухой массы) — из корней растений в открытом грунте. Изоляты, идентифицированные как *Enterobacter* sp., продуцировали ИУК в чистых культурах, и ее синтез усиливался на питательной среде с триптофаном. Эти изоляты использовали для инокуляции микроразмноженных растений. Максимальное повышение массы корней и побегов и наибольшую активность азотфиксации наблюдали в случае штамма SC20. У мяты перечной (*Mentha piperita*) при изучении роста *in vitro* и синтеза терпена в ответ на инокуляцию листьев грибными эндофитами отмечалось усиление роста растений, увеличение площади листовой поверхности, содержания сухого вещества, биомассы корней, а также повышение содержания ментола (24).

Непатогенные штаммы бактерий *Paenibacillus glucanolyticus*, *Curtobacterium pusillum* и *Methylobacterium extorquens* были изолированы из культуры тканей растений хосты и малины (54). Этими бактериями инокулировали микропобеги хризантемы (*Chrysanthemum × hortorum*), герберы (*Gerbera jamesonii*), хосты (*Hosta japonica*) и розы (*Rosa* sp.). Бактерии *C. pusillum* стимулировали формирование боковых побегов у всех изученных генотипов. При инокуляции *M. extorquens* число и длина побегов и корней у герберы и хосты и число побегов у хризантемы были выше, а длина побегов у хризантемы и розы и длина корней у розы — ниже, чем в неинокулированном контроле. *P. glucanolyticus* влиял на число и длину побегов у хризантемы и герберы, но при этом число корней у герберы и хосты оказалось ниже, чем в контроле без инокуляции, а длина корней у розы составила всего 0,2 см. Все три штамма бактерий ассимилировали атмосферный азот, а *M. extorquens* и *P. glucanolyticus* также синтезировали ИУК.

Биофертилизация микроорганизмами увеличивает жизнеспособность размноженных *in vitro* растений на этапе акклиматизации *ex vitro*. Так, в исследованиях чешских ученых (20) из корней нескольких растений-хозяев, принадлежащих к порядку *Ericales* (*Vaccinium* sp., *Calluna* sp., *Rhododendron* sp., *Empetrum* sp. и др.), было выделено более 200 штаммов эндофитных грибов. В этих экспериментах 10 % выделенных штаммов оказались эффективными и положительно влияли на рост микроразмноженных растений видов рододендрона (*Rhododendron* sp.) при акклиматизации *ex vitro* в торфяном субстрате. Негативного действия на рост растений-хозяев ни у одного из изолятов не наблюдали. В другой работе (55) при оптимизации схемы производственного размножения лекарственного растения баптизии *Baptisia tinctoria* *in vitro* было показано, что применение

арбускулярных микоризных грибов повышало процент акклиматизации микропобегов и укорененных микрорастений.

Таким образом, как свидетельствуют результаты исследований, сокультивирование микропобегов растений и эндофитных микроорганизмов может быть эффективным приемом преодоления сложностей, возникающих при микроразмножении *in vitro* у некоторых видов.

Биопротекторная активность эндофитов. Изучение потенциала штамма ризобактерий *Pseudomonas* sp. PsJN как стимуляторов роста и повышения устойчивости винограда (*Vitis vinifera* L.) к серой гнили, вызываемой *Botrytis cinerea*, показало, что инокуляция приводит к значительному усилению роста растений, делая их более стойкими и жизнеспособными (56). Наблюдаемый эффект усиливался при пересадке. Сокультивирование с *B. cinerea* приводило к существенным различиям в агрессивности патогена у инокулированных и интактных растений. В присутствии изучаемого штамма растения становились более устойчивыми к патогену.

Еще один наглядный пример биопротекторного потенциала эндофитов — культура тканей банана (42). Одно из наиболее серьезных вирусных заболеваний банана вызывает *Banana bunchy top virus* (BBTV). Обработка микрорастений банана *in vitro* микробными инокулятами (*Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus* sp., выделенные из корней банана) повышала устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам. Для этого микроразмноженные растения банана инокулировали штаммами *Pseudomonas fluorescens* Pf1 и СНА0 в сочетании с эндофитными бактериальными штаммами ЕРВ5 и ЕРВ22 (Pf1 + СНА0ЕР + В5 + ЕРВ22), что существенно ограничивало развитие инфекции BBTV в полевых условиях (частота заражения 33.33 %, или на 60 % меньше, чем в контроле). Выработка защитных ферментов и белков была больше, а морфологические и физиологические характеристики оказались лучше у растений, обработанных ризосферными и эндофитными бактериями (в частности, растения реагировали на обработку усилением роста). В этом сообщении продемонстрирована индукция системной устойчивости у банана с помощью ассоциированных бактерий, что может иметь практическое значение для разработки приемов защиты культуры банана от вируса BBTV (42).

Некоторые авторы отмечают, что системный биопротекторный эффект зависит от степени колонизации тканей микробиотой (57). Так, у пшеницы наблюдаемый антагонизм эндофитов в отношении патогенной микрофлоры был в большей степени следствием активации защитных механизмов растения-хозяина, а не результатом прямых антагонистических отношений в микробиоте (58). В экспериментах по изучению влияния эндофитного гриба *Neotyphodium lolii* на индукцию специфических защитных механизмов заселенные растения оказались гораздо менее восприимчивы к инфекции *Fusarium poae*. У многолетних трав, заселенных эндофитами, количество хитиназ существенно выше, чем у интактных растений, и зависит от времени инокуляции (59).

Некоторые эндофиты способны положительно влиять на устойчивость растений к неблагоприятным абиотическим факторам (60). Так, микоризные грибы улучшают нейтрализацию натрия при солевом стрессе (61), что может служить механизмом повышения толерантности растений в условиях засоления. Подобный прием используют и в культуре тканей, чтобы усилить адаптивность растений к абиотическому стрессу (в частности, к солевому), и некоторые эндофиты рассматриваются при этом как полезные и эффективные инструменты (62).

Достижения и проблемы идентификации и применения

эндофитов в биотехнологии. Развитие современных методов микроскопии и молекулярных технологий (например, омиксные технологии — omics technologies) позволило глубже понять взаимодействия в системе растение—эндофитные микроорганизмы, механизмы мутуализма и патогенности, что наглядно показали P.R. Hardoim с соавт. (63), экологически и эволюционно обосновав термин «микробные эндофиты». Секвенирование ДНК и РНК радикально изменило подход к изучению микробных сообществ (64, 65). В результате применения этих методов получено много новых данных о микроорганизмах, ассоциированных с растениями (66), однако здесь возникает проблема интерпретации и анализа этого огромного объема генетической информации для ее эффективного использования (67). Полное секвенирование эндофитного метагенома остается сложной задачей, так как требует разделения генома растения-хозяина и метагенома эндофитов (68). Относительно легкий прием — анализ состава микробных эндофитных сообществ с помощью ПЦР, позволяющий определить таксономический состав такого сообщества и его структуру (69), что, в свою очередь, может отражать функциональные модификации в группах микроорганизмов (70).

В качестве примера приведем исследование эндофитных бактериальных сообществ у шести генотипов *Prunus avium* L., различающихся характером роста при микроразмножении *in vitro* (38). Для анализа некультивируемых фракций эндофитных бактерий была составлена клонированная библиотека амплифицированных фрагментов 16S рДНК. Бактериальное разнообразие исследовали с помощью анализа длины рестрикционных фрагментов (restriction fragment length polymorphism — RFLP) рибосомальной ДНК с секвенированием клона для каждой определенной таксономической единицы. Для этого использовали праймеры 799f и 1492g-Y, позволяющие разделить амплифицированные фрагменты 16S рДНК. Очищенные ПЦР-продукты были клонированы в векторе pJet1.2 и перенесены в *Escherichia coli* DH10B. Устойчивые к ампициллину колонии *E. coli* отбирали и тестировали в ПЦР с использованием рестриктаз HpaII, HhaI и BsuRI. В результате преобладающей группой эндофитов оказались микобактерии *Mycobacterium* sp., выявленные в клонированных библиотеках у всех анализируемых генотипов рода *Prunus*. Другими доминантными бактериальными группами у легко-размножаемых генотипов были *Rhodospseudomonas* sp. и *Microbacterium* sp. Структура эндофитных сообществ существенно различалась у легко- и трудноразмножаемых *in vitro* генотипов: у первых выявили группы бактерий, стимулирующие рост растений.

Что касается промышленного применения эндофитов в биотехнологии и производства препаратов биоинокулянтов, то главная проблема заключается в поиске наиболее эффективного штамма или комбинации штаммов. Более 80 % эндофитов не выявляются при высеве на общепринятые питательные среды (71), что создает трудности при получении чистой культуры, идентификации и использовании многих штаммов. Кроме того, необходимо быть уверенным, что выделенный эндофит снова заселит внутренние ткани растений и будет оказывать положительный эффект. Еще одна трудность — совместимость эндофитов, выделенных из одного о вида растений с растениями другого вида.

Итак, один из инновационных подходов, признаваемый международными экспертами перспективным для формируемой сельскохозяйственной модели, заключается в применении биологизированных технологий на основе естественных процессов, происходящих в системе почва—растение. В этой связи ассоциированные с растением микроорганизмы и продукты

их метаболизма рассматриваются как ресурс при разработке биотехнологий и их применения для эффективной адаптации и укоренения микроклонов, а также в защите растений. При введении растительных эксплантов в стерильную культуру они подвергаются стрессовому воздействию из-за повреждения тканей и обработки агрессивными стерилизующими веществами, антибиотиками и др. Это может быть причиной внезапного возникновения вредоносных эндофитов в процессе последующего пассирования. Какой фактор изменяет характер взаимодействия эндофита и его хозяина, приводя к развитию патологического процесса вместо мутуалистических взаимоотношений, пока неясно. Единственным способом контролировать процессы в таких системах остается выбор оптимального времени пассирования, оптимальных условий культивирования и состава питательной среды для поддержания мутуалистического симбиоза, выгодного как для растения-хозяина, так и для его эндофитов.

ФГБНУ Всероссийский НИИ цветоводства
и субтропических культур,
354002 Россия, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28,
e-mail: bfbr@vniisubtrop.ru, MalukovaLS@mail.ru,
samarinalidia@gmail.com

Поступила в редакцию
29 июня 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 5, pp. 917-927

ENDOPHYTES, AS PROMOTORS OF *in vitro* PLANT GROWTH (review)

L.S. Samarina, V.I. Malyarovskaya, E.V. Rogozhina, L.S. Malyukova

All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Federal Agency of Scientific Organizations, 2/28, ul. Yana Fabritsiusa, Sochi, 354002 Russia, e-mail bfbr@vniisubtrop.ru, MalukovaLS@mail.ru, samarinalidia@gmail.com (corresponding author)

ORCID: Malyukova L.S. orcid.org/0000-0002-0500-1198

The author declares no conflict of interests

Received June 29, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.5.917eng

Abstract

In vitro plant propagation is a developed biotechnology, however until now there are no effective protocols for many perennials, especially for trees. High contamination of mature explants during tissue culture initiation, low multiplication and rooting during following passages are the main challenges. Aseptic culture of explants is associated with stress due to tissue damage and exposition to aggressive disinfectants and antibiotics during initiation. These could be the reasons of virulence of endophytes in following propagation. Plant-associated microorganisms were until recently seen as a problem for micropropagation, leading to contamination of *in vitro* explants. However recent studies showed that colonization of endophytes often play crucial role for increasing viability of *in vitro* and *ex vitro* plants. Most endophytes affect positively plant growth, providing nutrients and exhibiting antagonism to pathogens, as well as decreasing stress effects on plants. Beneficial effects were obtained in using *Beauveria bassiana* (J. Akello et al., 2007), *Piriformospora indica* and other members of family *Sebacinales* (P. Sharma et al., 2014), *Fusarium oxysporum* (A.S.Y. Ting et al., 2008), *Ophiotoma*-like fungi (M. Mucciarelli et al., 2003), *Phialocephala fortinii* (M. Vohnik et al., 2003), *Trichoderma harzianum* and other *Trichoderma* species (P. Franken et al., 2012). Of bacteria, *Acetobacter diazotrophicus* (C.O. Azlin et al., 2007), *Achromobacter xylosoxidans* (A. Benson et al., 2014), *Azospirillum brasilense* (E.E. Larraburu et al., 2015), *Azotobacter chroococcum* (E.E. Larraburu et al., 2007), *Bacillus subtilis* (M. Vestberg et al., 2004), *B. megaterium* (P. Trivedi et al., 2007), *Burkholderia phytofirmans* (E.A. Ait Barka et al., 2000), *B. vietnamiensis* (M. Govindarajan et al., 2006), *Enterobacter* sp. (M.S. Mirza et al., 2001), *Klebsiella variicola* (C.-Y. Wei et al., 2014), *Microbacterium* sp. (M. Quambusch et al., 2014), *Pseudomonas fluorescens* (J. Thomas et al., 2010) и *P. putida* (R. Lifshitz et al., 1987) also can beneficially influence plants. But until now it is unclear which factor is a trigger switched endophytes from mutualism to virulence. The only way to control such a change is to develop optimal conditions (time of obtaining explants, culture media composition and pH, temperature, etc.) in view to save *in vitro* mutualism with benefit for both host plant and the endophyte. Studies of many perennials showed the *in vitro* biotization to be helpful in microclonal propagation and plant rooting. Particularly, arbuscular micorhyza, ectomicorhyzal fungi, ericoid micorhyzal fungi, and wide range of bacteria influence positively plant micropropagation. Bacterial and fungal en-

dophytes could stimulate plant growth due to activation of plant protection mechanisms, induction of systemic resistance to pathogens, phytohormone synthesis and better transport of water and nutrients. In this, the difficulties of classification and obtaining pure cultures of microorganisms are the main problems faced with.

Keywords: micropropagation, endophyte, plant culture media, growth regulators, phytohormones.

REFERENCES

1. Prakash J. Micropropagation of ornamental perennials: progress and problems. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 2009, 812: 289-294 (doi: 10.17660/ActaHortic.2009.812.39).
2. Taylor J., Harrier L. Beneficial influences of arbuscular micorrhizal fungi on the micropropagation of woody and fruit trees. In: *Micropropagation of woody trees and fruits. Forestry sciences*. V. 75. S.M. Jain, K. Ishii (eds.). Springer, Dordrecht, 2003: 129-150 (doi: 10.1007/978-94-010-0125-0_5).
3. Kloepper J.W., McInroy J.A., Hu C.-H. Association of plant damage with increased populations of deleterious endophytes following use of Benlate systemic fungicide. *Proc. 5th Int. Symp. «Endophytes for plant protection: the state of the art»* (Humboldt University, Berlin, 26-29 May, 2013). C. Schneider, C. Leifert, F. Feldmann (eds.). Berlin-Dahlem, 2013: 56-69.
4. Cassels A.C. Doyle - Prestwich B. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. In: *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. Boca Raton, 2011: 223-238 (doi: 10.1002/9780470054581.eib241).
5. Dunaeva S.E., Osledkin Yu.S. Bacterial microorganisms associated with the plant tissue culture: identification and possible role (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(1): 3-15 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.3eng).
6. Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gubaz S.L. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*, 2015, 43: 99-103 (in Russ.).
7. Malyarovskaya V.I. *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo*, 2012, 47(2): 161-167 (in Russ.).
8. Samarina L.S. *Optimizatsiya priemov mikrorazmnozheniya i sokhraneniya limona in vitro. Kandidatskaya dissertatsiya*. Moskva, 2013 (in Russ.).
9. Friesen M.L., Porter S.S., Stark S.C., von Wetteberg E.J., Sachs J.L., Martinez-Romero E. Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, 42: 23-46 (doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039).
10. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaeten S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2013, 64: 807-838 (doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106).
11. Jacobs S., Zechmann B., Molitor A., Trujillo M., Petutschnig E., Lipka V., Kogel K.-H., Schäfer P. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol.*, 2011, 156: 726-740 (doi: 10.1104/pp.111.176446).
12. Partida-Martínez L.P., Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.*, 2011, 2: 100 (doi: 10.3389/fpls.2011.00100).
13. Provorov N.A., Vorob'ev N.I. *Ekologicheskaya genetika*, 2013, 11(1): 12-22 (in Russ.).
14. Brinkmann N., Marheine M., Heine-Dobbernack E., Verbarq S., Frühling A., Spröer C., Mohr K.I., Schumacher H.M. Investigation of latent bacterial infections in callus cultures reveal new *Paenibacillus* species. In: *Endophytes for plant protection: the state of the art. Proc. 5th Int. Symp. «Endophytes for plant protection: the state of the art»* (Humboldt University, Berlin, 26-29 May, 2013). C. Schneider, C. Leifert, F. Feldmann (eds.). Berlin-Dahlem, 2013: 10-11.
15. Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gvasaliya M.V., Samarina L.S., Sokolov R.N. Propagation in vitro of subtropical, ornamental crops and endemic species of western caucasus: developed and improved protocols. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2014, 3: 49-58 (doi: 10.15389/agrobiology.2014.3.49eng).
16. Qin S., Xing K., Jiang J.H., Xu L.H., Li W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89(3): 457-473 (doi: 10.1007/s00253-010-2923-6).
17. Nowak J. Benefits of in vitro «biotization» of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*, 1998, 34: 122-130 (doi: 10.1007/BF02822776).
18. Rai M.K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*, 2001, 37: 158-167 (doi: 10.1079/IVP2000163).
19. Kapoor R., Sharma D., Bhatnagar A.K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Science Horticulturae*, 2008, 116: 227-239 (doi: 10.1016/j.scienta.2008.02.002).
20. Jansa J., Vosatka M. In vitro and post vitro inoculation of micropropagated Rhododen-

- drons with ericoid mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.*, 2000, 15: 125-136 (doi: 10.1016/S0929-1393(00)00088-3).
21. Akello J., Dubois T., Gold C.S., Coyne D., Nakavuma J., Paparu P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *J. Invertebr. Pathol.*, 2007, 96: 34-42 (doi: 10.1016/j.jip.2007.02.004).
 22. Sharma P., Karkwal A.C., Abidin M.Z., Varma A. *Piriformospora indica* improves micropropagation, growth and phytochemical content of *Aloe vera* L. plants. *Symbiosis*, 2014, 64: 11-23 (doi: 10.1007/s13199-014-0298-7).
 23. Ting A.S.Y., Meon S., Kadir J., Radu S., Singh G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *BioControl*, 2008, 53: 541-553 (doi: 10.1007/s10526-007-9093-1).
 24. Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C., Maffei M. In vitro and in vivo pepper-mint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist*, 2003, 158: 579-591 (doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00762.x).
 25. Vohnik M., Lukan S., Bahr E., Regvar M., Vosatka M., Vodnik D. Inoculation of *Rhododendron* cv. Belle-Heller with two strains of *Phialocephala fortinii* in two different substrates. *Folia Geobotanica*, 2003, 38: 191-200 (doi: 10.1007/BF02803151).
 26. Franken P. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2012, 96: 1455-1464 (doi: 10.1007/s00253-012-4506-1).
 27. Mayerhofer M.S., Kernaghan G., Harper K.A. The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 2012, 23: 119-128 (doi: 10.1007/s00572-012-0456-9).
 28. Azlin C.O., Amir H.G., Chan Lai K., Zamzuri I. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on root formation and growth of tissue cultured oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Biotechnology*, 2007, 6: 549-554 (doi: 10.3923/biotech.2007.549.554).
 29. Benson A., Joe M.M., Karthikeyan B., Sa T., Rajasekaran C. Role of *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 in micropropagation of endangered medicinal plant *Naravelia zeylanica* (L.) DC. *J. Plant Growth Regul.*, 2014, 33: 202-213 (doi: 10.1007/s00344-013-9363-3).
 30. Larraburu E.E., Llorente B.E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in vitro rooting of pink lapacho. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2015, 122: 175-184 (doi: 10.1007/s11240-015-0759-6).
 31. Larraburu E.E., Carletti S.M., Rodríguez Cáceres E.A., Llorente B.E. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. *Plant Cell Rep.*, 2007, 26: 711-717 (doi: 10.1007/s00299-006-0279-2).
 32. Vestberg M., Kukkonen S., Saari K., Parikka P., Huttunen J., Tainio L., Devos N., Weekers F., Kevers C., Thonart P., Lemoine M.C., Cordier C., Alabouvette C., Gianinazzi S. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Appl. Soil Ecol.*, 2004, 27: 243-258 (doi: 10.1016/j.apsoil.2004.05.006).
 33. Trivedi P., Pandey A. Biological hardening of micropropagated *Picrorhiza kurroa* Royel ex Benth., an endangered species of medical importance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23: 877-878 (doi: 10.1007/s11274-006-9293-3).
 34. Ait Barka E.A., Belarbi A., Hachet C., Nowak J., Audran J.C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, 186: 91-95 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09087).
 35. Govindarajan M., Balandreau J., Muthukumarasamy R., Revathi G., Lakshmina-Rasimhan C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant Soil*, 2006, 280: 239-252 (doi: 10.1007/s11104-005-3223-2).
 36. Mirza M.S., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P., Malik K.A. Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, 2001, 237: 47-54 (doi: 10.1023/A:1013388619231).
 37. Wei C.-Y., Lin L., Luo L.-J., Xing Y.-X., Hu C.-J., Yang L.-T., Li Y.-R., An Q. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. *Biol. Fertil. Soils*, 2014, 50: 657-666 (doi: 10.1007/s00374-013-0878-3).
 38. Quambusch M., Pirttilä A.M., Tejesvi M.V., Winkelmann T., Bartsch M. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology*, 2014, 34(5): 524-533 (doi: 10.1093/treephys/tpu027).
 39. Thomas J., Ajay D., Raj Kumar R., Mandal A.K.A. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2010, 101: 365-370 (doi: 10.1007/s11240-010-9687-7).

40. Lifshitz R., Klopper J.W., Kozłowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., Zaleska I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.*, 1987, 33: 390-395 (doi: 10.1139/m87-068).
41. Ovando-Medina I., Adriano-Anaya L., Chávez-Aguilar A., Oliva-Llave A., Ayora-Talavera T., Dendooven L., Gutierrez-Miceli F., Salvador-Figueroa M. Ex vitro survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlets inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10: 3454-3457 (doi: 10.3923/pjbs.2007.3454.3457).
42. Nowak J., Shulaev V. Priming for transplant stress resistance in in vitro propagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant*, 2003, 39: 107-124 (doi: 10.1079/IVP2002403).
43. Harish S., Kavino M., Kumar N., Saravanakumar D., Soorianathasundaram K., Samiyappan R. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. *Appl. Soil Ecol.*, 2008, 39: 187-200 (doi: 10.1016/j.apsoil.2007.12.006).
44. Zabetakis I. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria × ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1997, 50: 179-183 (doi: 10.1023/A:1005968913237).
45. Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H., Macias-Rodriguez L., Lopez-Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4: 701-712 (doi: 10.4161/psb.4.8.9047).
46. Compant D., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71: 4951-4959 (doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005).
47. Sziderics A.H., Rasche F., Trognitz F., Sessitsch A., Wilhelm E. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annum L.*). *Can. J. Microbiol.*, 2007, 53: 1195-1202 (doi: 10.1139/W07-082).
48. Lin L, Xu X.D. Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Curr. Microbiol.*, 2013, 67(2): 209-217 (doi: 10.1007/s00284-013-0348-z).
49. Igarashi Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetologica*, 2004, 18: 63-66 (doi: 10.3209/saj.18_63).
50. Rashad F.M., Fathy H.M., El-Zayat A.S., Elghonaimy A.M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol. Res.*, 2015, 175: 34-47 (doi: 10.1016/j.micres.2015.03.002).
51. Sousa J., Olivares F.L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2016, 3: 24 (doi: 10.1186/s40538-016-0073-5).
52. Normand L., Bärtschi H., Debaud J.C., Gay G. Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98: 759-766 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb06682).
53. Oliveira P., Barriga J., Cavaleiro C., Peixe A., Potes A.Z. Sustained in vitro root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry*, 2003, 76(5): 579-587 (doi: 10.1093/forestry/76.5.579).
54. Blaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M.S., Moenne-Loccoz Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, 56: 455-470 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x).
55. Zawadzka M., Trzciniński P., Nowak K., Orlikowska T. The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on in vitro multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants. *Journal of Horticultural Research*, 2013, 21(2): 41-51 (doi: 10.2478/johr-2013-0020).
56. Grotkass C., Hutter I., Feldmann F. Use of arbuscular mycorrhizal fungi to reduce weaning stress of micropropagated *Baptisia tinctoria* (L.) R. BR. *Acta Hort. (ISHS)*, 2000, 530: 305-312.
57. Barka E.A., Gognies S., Nowak J., Audran J.-C., Belarbi A. Inhibitory effect of endophytic bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol. Control*, 2002, 24: 135-142 (doi: 10.1016/S1049-9644(02)00034-8).
58. Khaosaad T., García-Garrido J.M., Steinkellner S., Vierheilig H. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol. Biochem.*, 2007, 39: 727-734 (doi: 10.1016/j.soilbio.2006.09.014).
59. Istifadah N., McGee P.A. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35: 411-418 (doi: 10.1071/AP06038).
60. Koczwara K., Pańka D., Jeske M., Musiał N. Effect of *Neotyphodium lolii* on pro-

- duction of β -1,3-glucanases and chitinases in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) infected by *Fusarium poae*. In: Endophytes for plant protection: the state of the art. *Proc. 5th Int. Symp. «Endophytes for plant protection: the state of the art»* (Humboldt University, Berlin, 26-29 May, 2013). C. Schneider, C. Leifert, F. Feldmann (eds.). Berlin-Dahlem, 2013: 123-124.
61. Singh L.P., Gill S.S., Tuteja N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(2): 175-191 (doi: 10.4161/psb.6.2.14146).
 62. Mohammad M.J., Malkawi H.I., Shibli R. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soils with different levels of salts. *J. Plant Nutr.*, 2011, 26: 125-137 (doi: 10.1081/PLN-120016500).
 63. Evelin H., Kapoor R., Giri B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany*, 2009, 104(7): 1263-1280 (doi: 10.1093/aob/mcp251).
 64. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015, 79: 293-320 (doi: 10.1128/MMBR.00050-14).
 65. Abbamondi G.R., Tommonaro G., Weyens N., Thijs S., Sillen W., Gkorezis P., Iodice C., Rangel W.M., Nicolaus B., Vangronsveld J. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2016, 3(1): 1-10 (doi: 10.1186/s40538-015-0051-3).
 66. Bonaldi M., Chen X., Kunova A., Pizzatti C., Saracchi M., Cortesi P. Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 25 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00025).
 67. Francis I., Holsters M., Vereecke D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environ. Microbiol.*, 2010, 12(1): 1-12 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01989.x).
 68. Nebbioso A., De Martino A., Eltzbany N., Smalla K., Piccolo A. Phytochemical profiling of tomato roots following treatments with different microbial inoculants as revealed by IT-TOF mass spectrometry. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2016, 3(1): 1-8 (doi: 10.1186/s40538-016-0063-7).
 69. Sessitsch A.I., Hardoim P., Döring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T., Mitter B., Hauberg-Lotte L., Friedrich F., Rahalkar M., Hurek T., Sarkar A., Bodrossy L., van Overbeek L., Brar D., van Elsas J.D., Reinhold-Hurek B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by meta-genomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2012, 25: 28-36 (doi: 10.1094/MPMI-08-11-0204).
 70. Bulgari D., Casati P., Crepaldi P., Daffonchio D., Quaglino F., Brusetti L., Bianco P.A. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77: 5018-5022 (doi: 10.1128/AEM.00051-11).
 71. Campisano A., Antonielli L., Pancher M., Yousaf S., Pindo M., Pertot I. Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. *PLoS ONE*, 2014; 9(11): e112763 (doi: 10.1371/journal.pone.0112763).
 72. Klocke E., Weinzierl K., Abel S. Occurrence of endophytes during *Pelargonium* protoplast culture. In: Endophytes for plant protection: the state of the art. *Proc. 5th Int. Symp. «Endophytes for plant protection: the state of the art»* (Humboldt University, Berlin, 26-29 May, 2013). C. Schneider, C. Leifert, F. Feldmann (eds.). Berlin-Dahlem, 2013: 94-99.