

УДК: 634.71:58.085

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ
(БЕНОМИЛ, ЦЕФОТАКСИМ) ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРЫ (IN VITRO)
МАЛИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ**

**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович (0000-0003-1376-6921),
Исакеев Майрамбек Кыдыралиевич (0009-0003-7540-7374),
Мамбетов Кумушбек Бекитаевич (0000-0003-1867-9560),
Ахмеджанов Максат Ахмеджанович (0009-0003-1937-773X)
Нурманов Чынгыз Абдыкадырович (0009-0000-1261-1157),
Боронбаева Аида Ильичевна (0009-0007-7923-8159)**

*Кыргызский национальный аграрный университет им. К. И. Скрябина, Бишкек,
Кыргызстан*

Аннотация: при введении в культуру *in vitro* малины обыкновенной наряду с ранее применяемыми препаратами использовались антимикробные препараты беномил и цефотаксим. Нами изучались эффективность различных концентраций этих препаратов против микроорганизмов. Экспериментально установлено, что использование 1 % раствора гипохлорита натрия в течении 5-7 мин была самой безвредной для обрабатываемых растений. Более высокие концентрации приводили к частичной или полной гибели растений. Лучший срок введения в культуру *in vitro* малины обыкновенной - появление минимум 10 почек на стебле, в период вегетации растений, при достижении роста малины 30-40 см. Наиболее эффективными оказались варианты со стерилизацией эксплантов 1 % раствором гипохлорита натрия в течение 5-7 минут с предварительной обработкой антимикробными препаратами: беномил 500 мг, цефотаксим 0,125 мг на 1 л в течение 3 часов, что обеспечивает увеличение числа жизнеспособных стерильных эксплантов до 20 %. То есть нами опытным путем установлено, что применение антимикробных препаратов (беномил, цефотаксим) при стерилизации эксплантов в сочетании с гипохлоритом натрия увеличивает приживаемость растений на 10 %.

Ключевые слова: стерилизация, беномил, цефотаксим, эксплант, культура *in vitro*, эпифитные и эндофитные микроорганизмы.

**КАДИМКИ МАЛИНА КУЛЬТУРАГА (IN VITRO) КИРГИЗҮҮДӨ МИКРОБГО
КАРШЫ ПРЕПАРАТТАРДЫ (БЕНОМИЛ, ЦЕФОТАКСИМ) КОЛДОНУУНУН
ТААСИРДҮҮЛҮГҮ**

**Нургазиев Рысбек Зарылдыкович (0000-0003-1376-6921),
Исакеев Майрамбек Кыдыралиевич (0009-0003-7540-7374),
Мамбетов Кумушбек Бекитаевич (0000-0003-1867-9560),
Ахмеджанов Максат Ахмеджанович (0009-0003-1937-773X)
Нурманов Чынгыз Абдыкадырович (0009-0000-1261-1157),
Боронбаева Аида Ильичевна (0009-0007-7923-8159)**

К. И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети, Бишкек, Кыргызстан

Аннотация: кадимки дан куурай (малина) *in vitro* культурага киргизүүдө мурда колдонулган дарылар менен бирге микробго каршы препараттар беномил жана цефотаксим колдонулган. Биз микроорганизмдерге каршы бул дарылардын ар кандай концентрациясынын таасирдүүлүгүн изилдедик. Натрий гипохлоритинин 1% эритмесин 5-7 мүнөттө колдонуу дарыланган өсүмдүктөр үчүн эң зыянсыз экендиги эксперименталдык түрдө аныкталган. Жогорку концентрация өсүмдүктөрдүн жарым-жартылай же толук куурашына алып келди. Кадимки дан куурайды *in vitro* культурасына киргизүү үчүн эң жакшы убакыт - малина 30-40 см бийиктикке жеткенде, өсүмдүктөрдүн вегетация мезгилинде жана сабагында 10 бүчүрдүн пайда болушу. Эң эффективдүү варианттар экспланттарды 1% натрий гипохлоритинин эритмеси менен 5-7 мүнөткө стерилизациялоо, микробго каршы препараттар менен алдын ала дарылоо: беномил 500 мг, цефотаксим 0,125 мг 1 литрге 3 саат бою. Бул жашоого жөндөмдүү стерилдүү экспланттардын санын 20% га чейин көбөйтүүнү камсыз кылат. Башкача айтканда, экспланттарды натрий гипохлорити менен айкалыштырып стерилизациялоодо микробго каршы препараттарды (беномил, цефотаксим) колдонуу өсүмдүктөрдүн жашоо көрсөткүчүн 10%ке жогорулатаарын эксперименталдык түрдө аныктадык.

Өзөктүү сөздөр: стерилдөө, беномил, цефотаксим, эксплант, *in vitro* культурасы, эпифиттик жана эндофиттик микроорганизмдер.

EFFICACY OF ANTIMICROBIAL AGENTS (BENOMYL, CEFOTAXIME) WHEN INTRODUCED INTO CULTURES (IN VITRO) OF COMMON RASPBERRY

Nurgaziev Rysbek Zaryldykovich (0000-0003-1376-6921),
Isakeev Mairambek Kydyralievich (0009-0003-7540-7374),
Mambetov Kymyshbek Bekitaevich (0000-0003-1867-9560)
Akhmedzhanov Maksat Akhmedzhanovich (0009-0003-1937-773X),
Nurmanov Chyngyz Abdykadyrovich (0009-0000-1261-1157),
Boronbaeva Aida Ilichevna (0009-0007-7923-8159).

Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan

Abstract: the antimicrobial drugs benomyl and cefotaxime were used in the *in vitro* culture of common raspberry along with previously used preparations. We studied the efficacy of different concentrations of these drugs against microorganisms. It was experimentally found that the use of 1% sodium hypochlorite solution for 5-7 min was the most harmless to the treated plants. Higher concentrations resulted in partial or complete death of plants. The best time for *in vitro* introduction of common raspberry into culture is when at least 10 buds appear on the stem, during the vegetation period of plants, when raspberry growth reaches 30-40 cm. The most effective were variants with sterilisation of explants with 1% sodium hypochlorite solution for 5-7 minutes with pretreatment with antimicrobials: benomyl 500 mg, cefotaxime 0.125 mg per 1 L for 3 hours, which provides an increase in the number of viable sterile explants up to 20%. That is, we have experimentally

established that the use of antimicrobials (benomyl, cefotaxime) in the sterilisation of explants in combination with sodium hypochlorite increases plant engraftment by 10%.

Keywords: *sterilisation, benomyl, cefotaxime, explant, in vitro culture, epiphytic and endophytic microorganisms.*

1. Введение

На сегодняшний день одним из экономически значимых растений в сельском хозяйстве нашей страны является малина. С экономической точки зрения ягодные культуры не только в нашей стране, но и во всем мире являются одними из самых быстро окупаемых культур и за короткий период времени приносят больше прибыли, чем другие культуры (Medelyaeva Z, Nozdracheva G, Mikulina Yu S., and Golikova S.A 2022). Из-за большого спроса в ягодах (большой рынок сбыта в соседние страны) и быстрой окупаемости отечественные фермеры с каждым годом все больше переходят на ягодные культуры, в том числе на культивирование малины. С переходом на культуру малины местные фермеры рожают спрос на качественные саженцы. С целью обеспечения качественными саженцами малины начали использовать методы биотехнологии. Одним из эффективных методов ускоренного размножения и получения оздоровленного (безвирусных) посадочного материала является технология микроклонального размножения растений (Filiz Altan, Betül Bürün and Nurettin Ahin 2010). При микроклональном размножении растений одним из важных и сложных этапов является получение стерильных микрорастений, оздоровленных от всевозможных контаминантов (инфекций).

Контаминация в культуре очень сильно мешает введению в культуру растений. Из-за контаминации срываются эксперименты и гибнут растительные экспланты которые вводятся в культуру (Leifert C., Waites W.M. 1992).

Питательная среда, которая используется для культивирования эксплантов растений содержит макро-, микроэлементы, углеводы, аминокислоты

и другие вещества, которыми питаются микроорганизмы. Поэтому микроорганизмы очень быстро размножаются в культуре, где культивируются растительные ткани (Leifert C., Waites W.M. 1992). Размножаясь, микроорганизмы очень быстро вырабатывают продукты своей жизнедеятельности, которые загрязняют питательную среду и тем самым убивают растительные ткани. Самым основным источником загрязнений в культуре являются вводимые в культуру экспланты растений. Так как используемые донорские растения содержат очень много видов микроорганизмов (бактерии и грибки), в том числе патогенные для самих растений (Shen H, Li Z, Han D, Yang F, Huang Q, Ran L 2010), Thomas P., Goplakrishnan C., Krishnareddy M. 2011). Микробные загрязнения можно разделить на два типа по обитанию эпифитные и эндофитные. Для очищения эпифитных загрязнителей растений можно использовать различные дезинфицирующие средства, которые используются в обычном быту. Работа усложняется, когда начинаем работу по стерилизации эндофитных микробов. Очень много попыток было использовано для удаления эндофитных микробов, начиная манипуляциями среды (температура культивирования, pH и др.) заканчивая ограничениями питательных веществ (Hirano SS, Upper CD 1990), Gunson HE, Spencer-Phillips PTN 1994), Herman EB 2004). Однако эффективность таких манипуляций было не удовлетворительным, так как от этих действий страдали и сами растительные ткани. Как только они возвращались к нормальным условиям для роста растений микроорганизмы опять активизировались. На сегодняшний день имеются очень много химических веществ, которые губительно действуют

на бактерии, однако их фитотоксическое воздействие на растительные ткани часто ограничивает их использование (Shehata A.M., Wannarat W., Skirvin R.M., Norton M.A. 2010). Некоторые исследователи писали об эффективности некоторых антибиотиков при использовании в малых концентрациях. Однако устойчивость растений к антимикробным веществам у разных растений были по-разному. Из-за этого для каждого вида растений их нужно использовать индивидуально и подбирать индивидуальный рецепт очищения и оздоровления (George E.F. 1993), Shields R., Robinson S.J., Anslow P.A. 1984). Поэтому в нашем исследовании мы искали эффективный метод использования антимикробных препаратов (беномил, цефотаксим) при введении в культуры (*in vitro*) малины обыкновенной.

2. Материалы и методы исследования

Исследования проведены в научно-производственной лаборатории «*in vitro*» при Кыргызском национальном аграрном университете им. К. И. Скрябина. Материалом для исследований служили экспланты малины обыкновенной в период их активной вегетации. Для стерилизации эпифитных микроорганизмов использовали 1% гипохлорит натрия, эндофитных микроорганизмов дополнительно использовали антимикробные препараты беномил и цефотаксим, путем добавления в культуральную среду. Экспланты растений культивировались в среде Мурасиге и Скуге (Murashige T., Skoog F. 1962). Приготовление питательной среды для индукции побегов, микрочеренкования растений в *in vitro* проводилось по общепринятым методикам (Калашникова Е.А., Родин А.Р. 2001), (Колбанова Е.В., Кухарчик Н.В. 2014). Культивирование растительных объектов *in vitro* осуществляли в специализированной комнате при контролируемых условиях освещенности (продолжительность фотопериода 16/8 ч) и температуры (22-24°C).

3. Результаты исследований

Этап введения в культуру – один из самых сложных этапов технологии микроклонального размножения, так как в этот период от инфекции и микроорганизмов, не представляющие угрозы для растений в обычной жизни могут погибнуть все исходные материалы (Medelyaeva Z., Nozdracheva G., Mikulina Yu S., and Golikova S.A. 2022). Поэтому все растительные экспланты до введения в культуру *in vitro* должны полностью простерилизованы. Для поверхностной стерилизации растительных тканей используют большой набор химических веществ. При подборе стерилизующих веществ необходимо учитывать не только уровень освобождения материала от контаминаций (микробных загрязнений), но и их действие на жизнеспособность эксплантов. Стоит отметить,

что увеличение времени воздействия, концентрация стерилизующих веществ, могут привести к снижению жизнеспособности эксплантов (George EF 1993).

Для стерилизации эпифитных микроорганизмов используют самые простые и доступные дезинфицирующие средства, которые не способны очищать от эндофитных микроорганизмов, живущих в межклеточных пространствах и внутри растений. Для очищения малины от эндофитных микроорганизмов нами были использованы антимикробные препараты - беномил и цефотаксим. Эти препараты обычно фитотоксичны для молодых побегов малины, поэтому перед нами была поставлена задача, установить сроки вегетации малины, когда полученные экспланты малины наиболее устойчивы к негативному воздействию вышеуказанных химических препаратов. Для определения оптимальных условий выдержки эксплантов растений малины в растворах изучаемых химических препаратов нами были использованы молодые побеги малины возрастом не более 25 дней (рис.1) и более взрослые растения сроком вегетации более

35 дней (рис.2). Нами установлено, что молодые экспланты растений до 25 дней более уязвимы химическому воздействию препаратов гипохлорита натрия, беномила и цефотаксима, с увеличением возраста малины до 35 дней и более (с образованием более 10 почек) устойчивость к вышеуказанным препаратам значительно

возрастает. Полученные результаты исследований, дают нам основание рекомендовать для введения в культуру *in vitro* использовать растения малины с возрастом более 35 дней, у которых образовывались более 10 почек на стеблях (рис.3, 4).

Проведенные эксперименты показали,



Рисунок 1. Молодое растение, в возрасте до 25 дней, менее 20 см в высоту, имеет 7 почек. При стерилизации в гипохлорите натрия растение быстро темнеет, начинает выделять большое количество фенола.



Рисунок 2. Взрослое растение, в возрасте более 35 дней, 40-50 см в высоту, имеет более 10 почек. Экспланты растения хорошо выдерживают стерилизацию в 1 % растворе гипохлорита натрия в течении 5-7 мин.



Рисунок 3. Растения: А) не выдержали стерилизацию (молодые побеги до 25 дней); Б) взрослые растения выдержали стерилизацию (более 35 дней).



Рисунок 4. Взрослое растение Б) после стерилизации 1 % раствором гипохлорита натрия, где не наблюдается почернений и ожогов.



Рисунок 5. Некроз тканей 25 дневных эксплантов малины А), при стерилизации в гипохлорите натрия



Рисунок 6. Ожог растения Б) при 10 мин. стерилизации гипохлоритом натрия

что молодые растения более уязвимы к химическим препаратам. Некроз тканей (рис.5) наблюдается уже после обработки эксплантов.

В дальнейшем перед нами была поставлена задача определить оптимальную концентрацию и время выдержки растений в стерилизационном растворе. Для определения этих показателей, нами был выбран самый распространённый, часто

применяемый препарат гипохлорита натрия, с испытанием концентраций препарата от 0,5% до 5% раствора и временем выдержки от 2 мин до 10 мин. Результаты испытаний показали, что с повышением концентрации раствора гипохлорита натрия и времени выдержки растений в растворе наблюдается повышение процента почернения и ожогов эксплантов (рис.6, таб.1).

Таблица 1. Выживаемость и контаминации эксплантов при стерилизации в растворе гипохлорита натрия с концентрацией от 0.5 до 5 % и времени от 2-х до 10 минут

NaClO, %	Время	2мин.	3мин.	4мин.	5мин.	6мин.	7мин.	8мин.	9мин.	10мин.
0.5	Выж. %	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Из них конт. %	100	100	100	100	100	100	100	100	99
1	Выж.	100	92	90	90	75	45	40	40	30-35
	Из них конт. %	99	98	97	90	90	90	90	90	90
2	Выж. %	80	75	75	70-75	70	70	65	65	65
	Из них конт. %	99	97	96	90	90	90	90	90	90
3	Выж.	90	80	75	60	60	50	50	45	45
	Из них конт. %	97	95	90	90	90	90	90	85	85
4	Выж.	80	75	74	55	55	50	50	45	45
	Из них конт. %	97	95	80	80	80	80	80	80	80
5	Выж.	65	5	0	0	0	0	0	0	0
	Из них конт. %	90	45	35	20	0	0	0	0	0

Из данных таблицы 1 видно, что оптимальные условия стерилизации для введения в культуру малины является раствор гипохлорита натрия с концентрацией 1 % и временем обработки от 5 до 7 минут (рис.4). При использовании более высоких концентраций наблюдается повышение процента имплантов с ожогами. Использование концентрации раствора ниже 1% приводит к потере способности стерилизации микроорганизмов. Результаты наших исследований показали, что

обработка 1 % растворе гипохлорита натрия в течение 5-7 минут является наиболее эффективным приемом стерилизации малины обыкновенной.

Как было отмечено выше 1 % раствор гипохлорита натрия очищает растения только от наружных поверхностных микроорганизмов, что является причиной высокого уровня контаминации (до 90 %) при дальнейшем культивировании стерилизованных растений (рис.7).

Поэтому нами было принято



Рисунок 7. Контаминация растения после стерилизации в 1% гипохлорите натрия

решение о применении комбинированного метода стерилизации растений, принцип которого заключается как в наружной так и во внутренней очистке растений. Опытным путем установлено, что самым распространенными загрязнителями растений при введении в культуру являются грибки, поэтому был выбран антигрибковый препарат беномил. Одной из основных причин использования беномила является отсутствие негативного

воздействия препарата на рост растений малины. Для уничтожения бактерий был использован антибактериальный препарат цефотаксим. Для определения оптимальной концентрации беномила, цефотаксима и времени эффективного воздействия вышеуказанных препаратов против возбудителей грибковых и бактериальных заболеваний малины нами были поставлены специальные опыты, результаты которых представлены в таблице 2 и рисунке 8.



Рисунок 8. Образование фенола при выдержке в беномиле более 4 часов

Таблица 2. Результаты выдержки растений малины в беномиле и цефотаксиме

Время удержания в беномиле (500 мг/л) и цефотаксиме (0,125 мг/л)	Уровень контаминации	Не выжили	жизнеспособные стерильные экспланты
1 час	100 %	100 %	0 %
2 час	90-95 %	90-95 %	5-10 %
3 час	80 %	80 %	20 %
4 час	65-70 %	85 %	15 %
5 час	55-60 %	95 %	5 %

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что применение комбинации препаратов - гипохлорита натрия, беномила и цефотаксима дают положительные результаты. Наилучшие результаты стерилизации малины получены при 3-х часовой выдержке в комбинации препаратов - 1% раствора гипохлорита натрия, беномила в концентрации 500 мг и цифотаксима концентрации 0,125 мг в 1 л дистиллированной воды. В

целом комбинированное использование вышеуказанных препаратов при стерилизации повышает выживаемость растений в культуре на 15-20 %. Увеличение времени выдержки малины в растворе приводит к повышенному образованию фенола (рис.8) и дальнейшей гибели растений. При выдержке растений менее 3 часов не происходит стерилизации малины, практически не получено ни одного стерильного экспланта.

4. Дискуссия

Вопросы стерилизации растений при введении в культуру *in vitro* являются одним из самых важных этапов в получении сертифицированного посадочного материала. Стерилизация растений - очень сложный технический этап, при котором необходимо убить патогенные микроорганизмы, не повреждая растительные ткани, что крайней сложно, поэтому ученые ищут методы, при которых ущерб будет минимален. В задачу наших исследований не входила проверка на фитотоксичность использованных химических препаратов, но мы наблюдали факты их отрицательного воздействия на экспланты малины, что наглядно видно из данных таблиц 1 и 2, в которых приведены данные по стерилизации растений. В таблице 1 наблюдается четкая корреляция между концентрацией, временем выдержки растений в гипохлорите натрия и выживаемостью растений. Из данных таблицы 2 видно, что при увеличении времени нахождения малины в беномиле и цефотаксиме, тем меньше количество жизнеспособных растений. Исследования проведенные [Yang H.J. (1976)] показали, что использование беномила до определенной концентрации дает положительные результаты, улучшается вегетативное развитие растений, но с увеличением концентрации беномила до 250 м/кг и выше она оказывает отрицательное воздействие на развитие растений (Yang H.J. 1976). Положительный эффект действия цефотоксима подтверждаются результатами исследований (Mathias, Boyd 1986); Pollock и др. (1983) и (Vaz et al. 1993). Muhammad Asif, Francis Eudes, Harpinder Randhawa, Eric Amundsen, Jay Yanke, Dean Spaner (2013) подтверждают что использование цефотаксима в концентрации 100 мкг/л дает положительный эффект, путем уничтожения практически всех бактериальных инфекций (Muhammad Asif, Francis Eudes, Harpinder Randhawa, Eric Amundsen, Jay Yanke, Dean Spaner 2013).

По вопросам поверхностной

стерилизации растений проведено достаточно много исследований, но большинство авторов отдают предпочтение гипохлориту натрия. Исследования (Waheeda and Shyam 2017), который провел испытания различных химикатов в разных концентрациях (Waheeda K., Shyam K.V. 2017), отмечает что самым эффективным препаратом для поверхностной стерилизации растений является хлорит ртути. Но работа с хлоритом ртути требует особых условий работы и утилизации, что весьма усложняет работу с препаратом, поэтому нами был выбран гипохлорит натрия. При использовании гипохлорита натрия очень важен правильный выбор оптимальной концентрации. Waheeda and Shyam (2017) отмечают, что использования гипохлорита натрия концентрацией 3-5% в течение нескольких минут является наиболее эффективной (Waheeda K., Shyam K.V. 2017). В наших исследованиях повышение концентрации гипохлорита натрия выше 3% дает отрицательный эффект, обработка 3%, 4% и 5% концентрацией значительно снижает процент жизнеспособных эксплантов малины. Нами установлено, что в условиях Кыргызстана, самой эффективной оптимальной концентрацией препарата для малины обыкновенной является 1% раствор гипохлорита натрия, но при этом процент полученных стерильных эксплантов были довольно низким. Поэтому для повышения эффективности стерилизации нами были дополнительно использованы препараты беномила и цефотаксима, что позволило увеличить процент полученных стерильных эксплантов малины.

5. Выводы

Проведенные нами исследования показали, что наиболее благоприятные условия для стерилизации малины создаются при использовании 1 % раствора гипохлорита натрия в течении 5-7 минут. Применение более высоких концентраций раствора приводили к частичной или полной гибели растений. При выдержке в 1 % растворе гипохлорита натрия

более 7 минут происходило выделение большого количества фенола, приводящие к некрозу тканей и гибели растений. Для полной стерилизации малины, очищения от вирусных и грибковых заболеваний необходимо использование 1 % раствора гипохлорита натрия в комбинации с противогрибковыми и противовирусными препаратами беномил и цефотаксим.

На основании полученных результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. Для введения в культуру *in vitro* малины обыкновенной необходимо использовать растения, достигшие возраста 35 дней и более, высотой 30-40 см, имеющие не менее 10 почек на стебле.

2. Наилучшие результаты получены в варианте опыта с стерилизацией эксплантов в 1 % растворе гипохлорита натрия, в течение 5-7 минут, с предварительной обработкой растений антимикробными препаратами: беномил 500 мг и цефотаксим 0,125 мг растворенных в 1 литре дистиллированной воды в течение 3 часов, что обеспечило получение не менее 20 % жизнеспособных стерильных, здоровых эксплантов.

Совместное, комбинированное использование антимикробных препаратов и гипохлорита натрия при стерилизации эксплантов малины увеличивает приживаемость растений примерно на 10 %.

6. Список использованной литературы

1. Калашникова Е. А., Родин А. Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии. Учебное пособие, Москва, 2001 г., 71 с.

2. Колбанова Е. В., Кухарчик Н. В. Технология создания оздоровленного маточного насаждения смородины чёрной в республике Беларусь РУП «Институт плодоводства», ул. Ковалева, 2, пос. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь.

3. Filiz Altan, Betül Bürün and

Nurettin Ahin (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (7), pp. 991-995.

4. George EF (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1*, Techonology, England: Exegetics Ltd., pp. 121-145.

5. Gunson HE, Spencer-Phillips PTN (1994) Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micro propagated plants. In: Nicholas JR (ed) *Physiology, growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 379–396.

6. Herman EB (2004) Recent advances in plant tissue culture VIII. microbial contaminants in plant tissue cultures: solutions and opportunities 1996–2003. *Agritech Consultants Inc, Shrub Oak*.

7. Hirano SS, Upper CD (1990) Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu Rev Phytopathol* 28:155–177.

8. Leifert C, Waites WM (1992) Bacterial growth in plant-tissue culture media. *J Appl Bacteriol* 72:460–466.

9. Mathias RJ, Boyd LA (1986) Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Plant Sci* 46:217–223.

10. Medelyaeva Z, Nozdracheva G, Mikulina Yu S, and Golikova S. A (2022). Cultivation technology and efficiency of berry crops production in the conditions of the Central Chernozem Region. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 949 012106.

11. Muhammad Asif, Francois Eudes, Harpinder Randhawa, Eric Amundsen, Jay Yanke, Dean Spaner (2013) Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. Article in *Plant Cell Reports*.

12. Murashige T. & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia*

Plantarum, 1962, v. 15, p. 473.

13. Pollock K, Barfield DG, Shields R (1983) The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep* 2:36–39.

14. Shen H, Li Z, Han D, Yang F, Huang Q, Ran L (2010) Detection of indigenous endophytic bacteria in *Eucalyptus urophylla* in vitro conditions. *Front Agric China* 4:37–41.

15. Shields R, Robinson SJ, Anslow PA (1984). Use of fungicides in plant tissue culture. *Plant Cell Rep.* 3: 33-36.

16. Shehata AM, Wannarat W, Skirvin RM, Norton MA (2010) The dual role of carbenicillin in shoot regeneration and somatic embryo genesis of horseradish (*Armoracia rusticana*) in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 102:397–402.

17. Thomas P, Goplakrishnan C, Krishnareddy M (2011) Soft rot inciting *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*) is unlikely to be transmitted as a latent pathogen in micro propagated banana. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105:423–429.

18. Vaz FBD, Dossantos AVP, Manders G, Cocking EC, Davey MR, Power JB (1993) Plant-regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *Flavicarpa degener*) - the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture-medium. *Plant Cell Rep* 12:220–225.

19. Waheeda K, Shyam K.V. (2017). Formulation of Novel Surface Sterilization Method and Culture Media for the Isolation of Endophytic Actinomycetes from Medicinal Plants and its Antibacterial Activity. *J Plant Pathol Microbiol* 2017, 8:2.

20. Yang HJ (1976). Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture media. *Hort. Sci.* 11(5): 473-474.