

ІЗОЛЯЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ЕНДОСИБІОНТУ З АСПЕТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *NICOTIANA TABACUM*

А.О. Потрохов¹, С.В. Літвінов²

^{1,2}Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

В асептичну культуру *in vitro* було введено рослини *Nicotiana tabacum* cv *Wisconsin*, шляхом стерилізації насіннєвого матеріалу у 30% розчині комерційного препарату “Білизна”. Після стерилізації насіння було перенесено на поживне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [1] для проростання. Після проростання з тканини листа тютюну було виділено бактеріальний штам, ймовірно *Pseudomonas* sp. Експланти, що містили в клітинах активний ендосимбіонт, відбирали по стійкості на селективній живильному середовищі, з додаванням антибіотику канаміцин. Рослини, які не містили в своєму складі ендосибіонту були не стійкими до антибіотика. Наявність і внутрішньоклітинна локалізація бактеріальних ендосимбіонтів, здатних до росту, поділу та зараження клітин господаря (в основному, флоєми листа і асиміляційної тканини) підтверджено за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. З розтертих тканин додатково стерилізованих експлантів через бактеріальні фільтри була виділена L-форма бактерій, представлена грам негативними клітинами різного розміру (0,3-3 мкм) та форм: округлі, паличкоподібні, неправильні форми. При культивуванні на твердому та рідкому середовищі МС, бактерія реверсувала в вегетативну форму. Колонії росли на різних поживних середовищах, як твердих щільних, так і рідких при температурному оптимумі 30°C. Персистенція L-форм досягалась в рідкому МС середовищі з додаванням солей ацетату натрію. Визначено, що бактерії розмножувались в мікроаерофільних і анаеробних умовах. Вегетативна форма утворювала колонії S-типу, які при старінні культури змінювались колоніями R-типу, а пізніше на колонії L-типу, що складались з клітин, які повністю або частково втратили клітинну стінку. S-колонії складались переважно з грам негативних паличковидних форм (розміри 1-3 мкм); R-колонії - з коккоподібних форм (розміри 0,5-1 мкм); L-колонії - з клітин різноманітних форм і розмірів (0,3-3 мкм) - коккоподібних, паличковидних, нитчастих, грушовидних, неправильної округлої або витягнутої форми, часто з випинаннями, інвагінаціями і внутрішніми везикулами.

Ізольований нами штам виявився стійкий до пеніциліну, канаміцину, ампіциліну, цефазоліну, цефотаксиму. Встановлено, що резистентність до антибіотиків визначається плазмідним фактором і втрачається після обробки бромистим етидієм. Цефтазидим індукує трансформацію вегетативної форми бактерій в L-форму, здатну проникати в клітини *Nicotiana tabacum*.

Культивування при температурі вище 35°C, призводило до інфільтрації бактерій на поверхню листа та утворення колоній S-форми *Pseudomonas* sp. Аналогічний ефект був помічений при дії іонізуючого випромінювання на культуру рослин тютюну. Відмічено, що бактеріальна активність була дозо залежною. Так при дозі в 20-23 Грея виділення бактерія не призводила до загибелі рослини, в той час як при збільшенні дози до 25 Грей, відбувалися процеси, які призводили до активізації фітопатогенних властивостей бактерії та швидкої загибелі рослин.

Маркером фітопатогенної трансформації є виділення бактеріями в живильне середовище ряду пігментів - піовердін, піорубін, піоціанін, піомеланін.

Латентна персистенція бактеріальних ендосимбіонтів в клітинах може впливати на результати лабораторних експериментів, а також на нормальну і патологічну фізіологію рослин в умовах стресової дії.

Триває робота по визначення штамової приналежності бактеріальної культури та її

детального опису.

Література

1. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F Skoog // *Physiol Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.