

АНТС-ПЭЭП СИЛЬВЕРЕ, МАРЕ-АННЕ РОМЕЙКИС

ИЗОЛИРОВАНИЕ ЭНДОФИТНОЙ БАЦИЛЛЫ ИЗ ТКАНЕЙ ЧЕРНОЙ СМОРОДИНЫ, ПОРАЖЕННОЙ РЕВЕРСИЕЙ

*ANTS-PEEP SILVERE, MARE-ANNE ROMEIKIS. ENDOPHYTIC BATSILLI ISOLEERIMISEST
REVERTEERUNUD MUSTA SÕSTRA KUDEDEST*

ANTS-PEEP SILVERE, MARE-ANNE ROMEIKIS. ISOLATION OF THE ENDOPHYTIC BACILLUS FROM THE TISSUES OF REVERTED BLACK-CURRANTS

В последние годы в тканях растений, пораженных болезнями типа желтухи (Doi и др., 1967; Maramorosch и др., 1968), были обнаружены микоплазмоподобные организмы и признаны вероятными возбудителями этих болезней (Shikata и др., 1969), что дает основание для подобного предположения и в отношении этиологии реверсии черной смородины (Silvere, Tiits, 1969). Так как при этой болезни отсутствуют пролиферация и гиперплазия флоэмы (Смит, 1960), наблюдаемые при типичных желтухах (Esau, 1967), поиски скоплений микоплазм в ситовидных трубках флоэмы черной смородины малоперспективны и поэтому была предпринята попытка изолировать предполагаемый возбудитель из тканей растения.

Ввиду внутритканевой локализации микоплазмоподобных организмов в растениях в опытах была использована питательная среда для культивирования тканей черной смородины, а также некоторые среды для культивирования бактерий, связанных с растениями. При этом учитывались и данные опытов культивирования органов черной смородины (Tiits, 1969), где в застоявшихся культурах органов больного реверсией растения отмечались образования, сходные с колониями бактерий. Опыты по изолированию предполагаемого возбудителя реверсии, материал для которых брался как с опытного участка, так и из теплиц, проводились в течение 1970 г.

Высеваемый материал — кусочки различных частей растений — стерилизовался предварительно в 0,1%-ном растворе сулемы в течение 15 мин, эффективность такой стерилизации проверялась в опытах по культивированию эпифитов больной и здоровой черной смородины: после 15-минутной стерилизации материала прекращался рост эпифитов, образующих из нестерилизованного материала быстрорастущие, преимущественно пигментированные колонии. Заметных различий между эпифитами здоровых и больных растений не отмечалось.

При посеве внешестерилизованного материала растений, пораженных реверсией черной смородины, вырастали беловатые слизистые колонии микроорганизмов, подобные которым не выявлены среди эпифитов как здоровых, так и больных растений. Рост колоний начинался всегда у обрезанных концов растений (рис. 1), где были обнажены внутренние ткани. При посеве размельченных тканей или сока, выступающего на стерильных срезах растений, колония образовалась на всей

Данные опытов по изолированию эндофитной бациллы черной смородины

Материал	Количество опытов		Время выращивания колоний, дни	Выращивание колоний на культуре больных растений, % *
	больные растения	здоровые растения		
Кусочки побегов	330	260	21—64	46
Сок, выступающий на стерильном срезе	30	5	21—25	50
Размельченные ткани побегов	35	5	14—25	80
Кусочки тканей ростового бугра галловой почки	30	5	7—12	100
Кусочки центральных жилок листьев	50	10	5—7	100

* Из материала со здоровых растений колонии бациллы не выросли.

засеянной поверхности почти одновременно (рис. 2), но, как правило, не раньше, чем через неделю после посева. О материале и результатах опытов дает обобщенное представление таблица.

По составу все колонии описанного типа были идентичными: с ростом их поверхность становилась суше и в них преобладали типичные споры бактерий (рис. 3). Vegetативные клетки, среди которых часто встречались спорулирующие — с терминальными или субтерминальными спорами, обнаруживались в основном в глубине колоний, непосредственно на питательной среде. Vegetативные формы представляли собой палочковидные малоподвижные клетки размером $0,5—1,0 \times 1,5—3,0$ мкм, размножающиеся поперечным делением, причем иногда дочерние клетки оставались соединенными в виде коротких коленчатых цепочек (рис. 4). В культуре изолированная спорообразующая бактерия оказалась грам-положительной.

Наиболее характерным для всех колоний было наличие в их составе, кроме вегетативных клеток и спор, сферических тел размером не более $0,3$ мкм (рис. 3). При окраске спор на хроматин по методу Пешкова

Рис. 1. Первичная колония ЭБРС из кусочков побега.

Joon. 1. Taime varre tükidest väljakasvanud reverteerunud sõstra endofüütse batsilli (RSEB) esmane koloonia.

Fig. 1. Primary colony of endophytic bacillus of reverted currants (EBRC) grown up from pieces of plant stem.

Рис. 2. Колония ЭБРС из размельченного растительного материала.

Joon. 2. Taime purustatud kudetest väljakasvanud RSEB koloonia.

Fig. 2. Colony of EBRC grown up from pounded plant tissues.

Рис. 3. Споры и микротельца ЭБРС в темнопольно-фазовоконтрастном освещении. Увел. $1000\times$.

Joon. 3. RSEB spoorid ja mikrokehad pimevälja-faasikontrastses valgustuses. Suurend. $1000\times$.

Fig. 3. Spores and microbodies of EBRC in darkfield-phasecontrast microscope. Magnif. $1000\times$.

Рис. 4. Вегетативные клетки ЭБРС. Увел. $4250\times$.

Joon. 4. RSEB vegetatiivsed rakud. Suurend $4250\times$.

Fig. 4. Vegetative cells of EBRC. Magnif. $4250\times$.



1



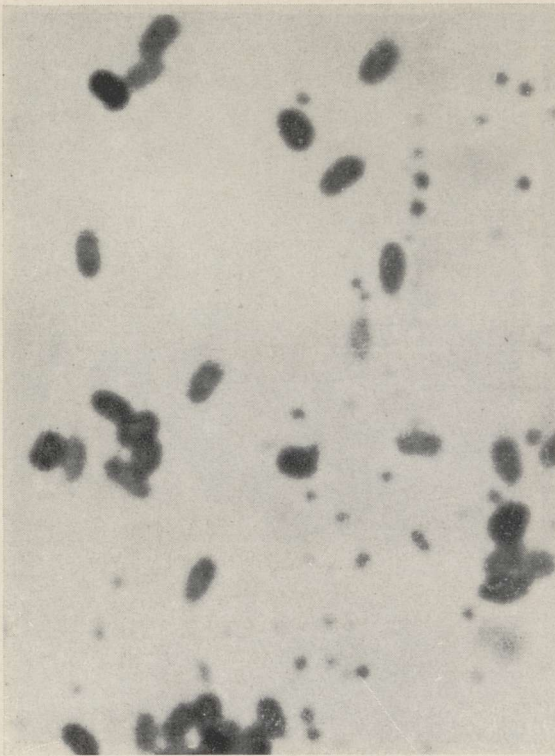
2



3



4



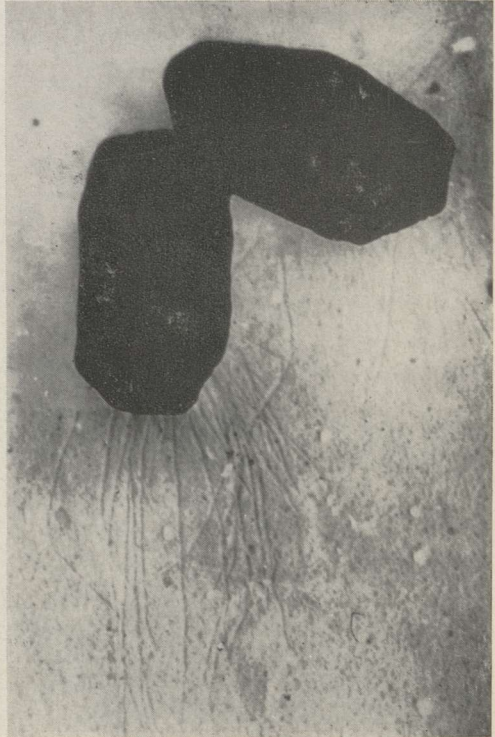
5



6



7



8

(1966) в голубой или синий цвет окрасились и упомянутые микротельца (рис. 5); выяснилось, что они образуются в спорулирующих клетках параллельно эндоспоре (рис. 6), но не в контакте с последними, как это характерно для белковых, не содержащих хроматина параспоральных телец. Обнаруженные нами микротельца могут, очевидно, состоять из не вошедшего в состав спор хроматинового вещества бактериальной клетки (Пешков, 1966); образование этих телец внутри спорулирующей клетки подтверждают предварительные электронно-микроскопические исследования (рис. 7). Для спор изолированной нами *бациллы* характерно наличие выростов (рис. 8), сходных с фимбриями или жгутиками, описанными в основном у спор анаэробных *бацилл* (Красильников, Дуда, 1966).

Опыты по термической инаktivации культур по Фробишеру (1965) показали, что после нагревания при 90 °C в течение 10 мин из нашей культуры через 10 дней вырастали нормальные колонии, что свидетельствует о наличии в нагретой культуре термостабильных эндоспор. Таким образом, можно заключить, что из тканей больной реверсией черной смородины изолирована специфическая спороносная *бацилла*, характерным свойством которой можно считать вырастание первичных колоний исключительно на среде для культивирования тканей черной смородины, хотя при пересеве такой колонии на некоторые другие среды, применяемые для культивирования бактерий, связанных с растениями, наблюдается более или менее нормальный рост колоний. Характерно для нее и чрезвычайно интенсивное спорообразование, сопровождающееся формированием в спорулирующих клетках хроматин-содержащих сферических микротелец, не описанных, по нашим данным, при споруляции типичных *бацилл*. Объем опытов и однозначность полученных результатов, как и специфические черты изолированной *бациллы*, позволяют, на наш взгляд, провизорно назвать ее *эндофитной бациллой ревертированной смородины (ЭБРС)*.

Возвращаясь к исходной гипотезе нашего исследования — проблеме микоплазменной этиологии реверсии черной смородины, нужно сказать, что никаких данных о связи ЭБРС с предполагаемым возбудителем реверсии, за исключением приуроченности ЭБРС именно к тканям пораженного растения, мы не имеем. Не описано и реверсирование обнаруженных в растениях микоплазм в *бациллярные* формы. Однако нельзя

Рис. 5. Споры и микротельца ЭБРС, окрашенные на хроматин. Увел. 4250×.

Joon. 5. Kromatiini värvustumine RSEB spoorides ja mikrokehades. Suurend. 4250×.

Fig. 5. Spores and microbodies of EBRC stained for chromatin. Magnif. 4250×.

Рис. 6. Спорангий ЭБРС, окрашенный на хроматин. Видны плотные проспоры и микротельца. Увел. 4250×.

Joon. 6. Kromatiini värvustumine RSEB sporangiumides, näha prospoovid ja mikrokehad. Suurend. 4250×.

Fig. 6. In sporangia of EBRC stained for chromatin, the prospores and microbodies are visible. Magnif. 4250×.

Рис. 7. Спорангий ЭБРС, содержащий зрелую спору, и микротельце; аналогичное свободное тельце в верхней части рисунка. Увел. 35 000×.

Joon. 7. Valminud spoori ja mikrokeha sisaldav RSEB sporangium, teine — vaba mikrokeha joonise ülasas. Suurend. 35 000×.

Fig. 7. Mature spore and microbody in the sporangium of EBRC, another free microbody is visible in the upper part of figure. Magnif. 35 000×.

Рис. 8. Споры ЭБРС с фимбриеподобными выростами оболочки. Увел. 35 000×.

Joon. 8. RSEB spoorid fimbriumi detaoliste spoorikesta jätketega. Suurend. 35 000×.

Fig. 8. Spores of EBRC with fimbrium-like extensions of spore envelope. Magnif. 35 000×.

и не учитывать исключительность изолирования бациллы из тканей растения (Горленко, 1961; Новиков, 1963; Hayward, 1964; Возняковская, 1969), специфичность условий выращивания колоний ЭБРС, их несомненную связь с внутренними тканями растений, а также наличие некоторых микоплазмоподобных структур в этих тканях (Silvere, 1970), что может в данном случае указывать на реверсирование каких-либо суббактериальных форм в бациллярные.

На основе вышесказанного мы считаем необходимым наряду с изучением культурных свойств, тонкого строения различных форм и особенностей споруляции бациллы при дальнейших исследованиях иметь в виду как возможную этиологическую связь ЭБРС с реверсией черной смородины, так и значение ее изолирования для диагностики этой болезни.

ЛИТЕРАТУРА

- Возняковская Ю. М., 1969. Микроорганизмы растений и урожай. Л.
 Горленко М. В., 1961. Бактериальные болезни растений. М.
 Красильников Х. А., Дуда В. И., 1966. Ультраструктура выростов на поверхности спор анаэробных бактерий. Докл. АН СССР **171** (4—6) : 1196—1197.
 Новикова Н. С., 1963. Бактериальная флора надземных органов растений. Киев.
 Пешков М. А., 1966. Сравнительная цитология синезеленых водорослей, бактерий и актиномицетов. М.
 Смит К., 1960. Вирусные болезни растений. М.
 Фробишер М., 1965. Основы микробиологии. М.
 Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., 1967. Mycoplasma- or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or Paulewnia witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **33** : 259.
 Esau K., 1967. Anatomy of plant virus infection. Ann. Rev. Phytopathology **5** : 45—76.
 Hayward A. C., 1964. Bacteria in relation to plants. In: Viewpoints in Biology **3** : 116—169.
 Maramorosch K., Shikata E., Granados R. R., 1968. Structures resembling mycoplasma in diseased plants and insect vectors. Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II **30** (6) : 841—855.
 Shikata E., Maramorosch K., Ling K. C., 1969. Presumptive mycoplasma etiology of yellows diseases. FAO Plant Protec. Bull. **17** (6) : 121—128.
 Silvere A.-P., 1970. Mycoplasma-like organisms in association with black-currant reversion. X International Congress for Microbiology, Abstracts. Mexico : 222.
 Silvere A.-P., Tiits A., 1969. Mükoplasmataolised mikroorganismid — uus probleem fütopatoloogias. ENSV TA Toimet., Biol. **18** (2) : 228—230.
 Tiits A., 1969. Studies on the etiology and pathology of the black-currant reversion. II. Preliminary observations on the growth of infected plant floral organs *in vitro*. ENSV TA Toimet., Biol. **18** (3) : 348—350.

Институт экспериментальной биологии
 Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
 30/III 1971

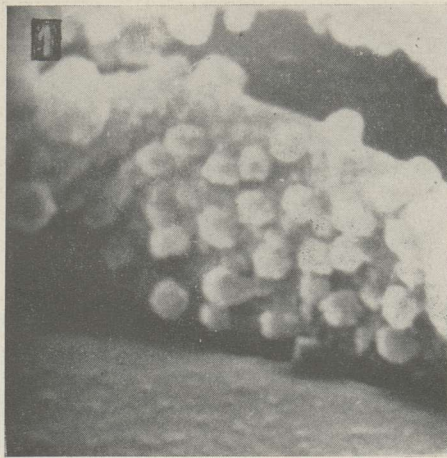


Рис. 1. *Dasyscyphus brasiliensis*; 10 600 $\times$.



Рис. 2. *Dasyscyphus virgineus*; 11 100 $\times$.

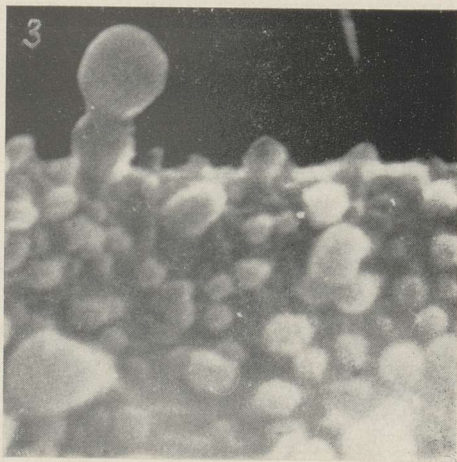


Рис. 3. *Lachnellula arida*; 14 500 $\times$.

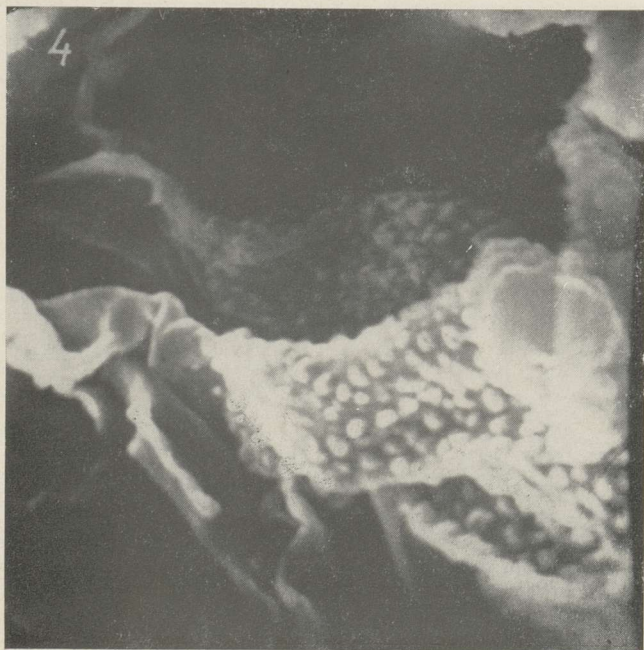


Рис. 4. *Clavisdisculum crassipilum*; 6050 $\times$.

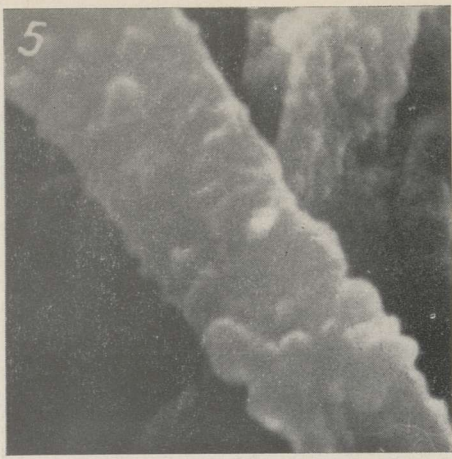


Рис. 5. *Dasyscyphella nivea*; 11 200 $\times$.

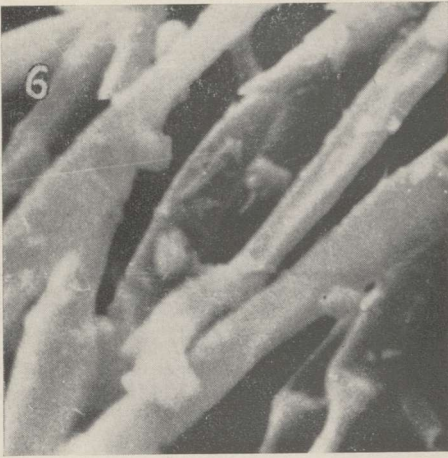


Рис. 6. *Belonidium leucophaeum*; 2300 $\times$.



Рис. 7. *Hyaloscypha lectissima*; 2470 $\times$.



Рис. 8. *Dasyscyphella nivea*; 1050 $\times$.