

**РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У МОДЕЛЬНІЙ СИСТЕМІ  
«*Nicotiana tabacum* – ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ» ПІД ВПЛИВОМ  
ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ**

**А.М.Рибницька<sup>1</sup>**, студентка, **А.В.Харіна<sup>1</sup>**, кандидат біологічних наук,

**Н.О.Козировська<sup>2</sup>**, кандидат біологічних наук

1 – ННЦ «Інститут біології», 2 – Інститут молекулярної біології та генетики  
НАН України

Викладено результати досліджень впливу ендofітних бактерій на розвиток вірусної інфекції у модельній системі «*Nicotiana tabacum* - вірус тютюнової мозаїки». Показано, що обробка рослин ендofітною бактерією *Pantoea agglomerans* призводить до зниження вмісту вірусного антигена на  $41\pm 5\%$  у рослинному матеріалі і пригнічення розвитку фітовірусної інфекції.

**Ключові слова:** *Ендofітні бактерії, вірус тютюнової мозаїки, фітопатогени*

Вірусні захворювання рослин є надзвичайно актуальною проблемою сільського господарства, оскільки традиційні методи їх контролю часто можуть бути недостатньо ефективними. Перш за все це стосується використання хімічних агентів, які до того ж становлять небезпеку для довкілля і здоров'я населення. Тому перспективним напрямом є пошук можливостей застосування біологічних об'єктів для захисту рослин від фітопатогенів [1]. До таких організмів в першу чергу належать ендofітні бактерії, або ендofіти, – непатогенні мікроорганізми, які за природних умов населяють рослинні тканини. Ендofітні бактерії здатні співіснувати з рослинним організмом, не спричиняючи шкоди і надаючи йому певної користі. На відміну від симбіотичних та деяких патогенних бактерій, ендofіти не мають специфічності

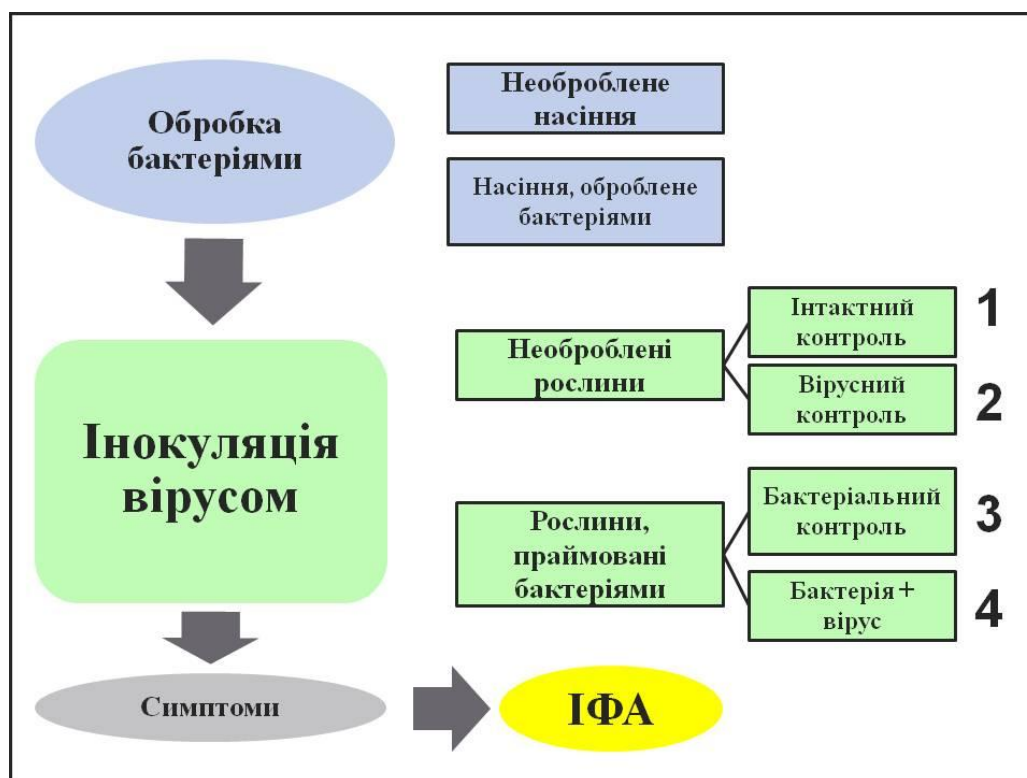
до хазяїна і не призводять до формування анатомічних структур на зразок бульбочок чи галів. Проте порівняно з вільно існуючими бактеріями, ендofіти утворюють стабільніші асоціації з рослиною [2].

Біологічний контроль фітопатогенів рослина здійснює за допомогою природного імунітету (стійкості, резистентності) до певного збудника або до їх широкого спектра. Природна імунність рослини забезпечується конститутивним та індукованим механізмами. Конститутивний механізм зумовлений будовою клітинної стінки рослини, а різновиди індукованих виникають після її взаємодії з патогенними некротичними мікроорганізмами, непатогенними бактеріями, а також після обробки деякими природними чи синтетичними речовинами [3].

Дослідження індукції системної резистентності ендofітними бактеріями є першим кроком на шляху створення антивірусних препаратів біологічного походження без використання синтетичних речовин.

**Мета дослідження** – вивчити вплив ендofітних бактерій на ріст рослин і розвиток вірусної інфекції у модельній системі «*Nicotiana tabacum* cv. Trapesund – вірус тютюнової мозаїки».

**Матеріал та методика досліджень.** Об'єктами досліджень були чотири групи рослин *Nicotiana Tabacum* cv Trapesund, які вирощувались в однакових стандартних умовах. Рослини обробляли досліджуваними культурами шляхом замочування простерилізованого насіння тютюну в бактеріальній суспензії впродовж доби у термостаті за температури 25° С. Повторну обробку бактеріальними суспензіями листових пластинок рослин проводили за три дні до інокуляції вірусом. Зараження вірусом здійснювали на стадії трьох справжніх листків механічною інокуляцією з використанням карборунду як абразиву. Згідно із схемою досліду, рослини першої групи були повністю інтактними, другої – інокульовані вірусом без обробки бактеріями (вірусний контроль), третьої, навпаки, оброблені бактеріями, але не уражені вірусом (бактеріальний контроль), четвертої – оброблені бактеріями й інокульовані вірусом (рис.1).



**Рис. 1.** Дослідження впливу ендофітних бактерій на розвиток вірусної інфекції у модельній системі «*Nicotiana tabacum* – вірус тютюнової мозаїки»

У досліді використали такі бактерії: *Lactobacterium plantarum*, *Methylibacterium radiotolerans*, *Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans* і препарат ЕМ – консорціум кількох мікроорганізмів, до якого входили *Lactobacillus casei*, *Rodopseudomonas palustris*, *Sacharomyces cerevisiae*, надані лабораторією мікробної екології Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Для визначення концентрації вірусу у досліджуваних рослинах застосовували кількісний непрямий імуноферментний аналіз [4]. Результати ІФА реєстрували на автоматичному ELISA-рідері при довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат брали показник  $E_{405}$ , що принаймні вдвічі перевищував показник негативного контролю (сік здорової рослини) [5,6].

**Результати досліджень.** При візуальній діагностиці розвитку вірусної інфекції у рослин, оброблених ендофітними бактеріями, головними критеріями спостережень були фенотипові прояви (час і ступінь прояву симптомів), а також рівень накопичення рослиною вірусного антигена. Слід зазначити, що ці

параметри в оцінці індукції резистентності є незалежними, тобто кореляції між ними може не бути.

Симптоми вірусної інфекції у вигляді деформації листкової пластинки та системної мозаїки проявилися через 20 днів після інокуляції вірусом. При цьому однакові фенотипові прояви спостерігали на всіх рослинах, крім інтактних. Більше того, симптоми проявилися досить яскраво, навіть краще, ніж у контрольних рослин другої групи (вірусний контроль).

Разом з цим, було відзначено, що рослини, оброблені *Lactobacterium plantarum*, явно випереджали у рості як вірусний контроль, так і інтактних рослин. Також добре видно відмінності у розвитку кореневої системи дослідних рослин.

У рослин, оброблених, *Methilobacterium radiotolerans* ІМБГ 290, препаратом ЕМ, 65 *Pseudomonas sp.* на фоні яскравого прояву симптомів вірусної інфекції навіть спостерігали деяке пригнічення росту порівняно з рослинами, зараженими вірусом, але необробленими досліджуваними ендofітами (вірусний контроль) (рис.2). Це може свідчити про синергізм бактерій, використаних в експерименті, та вірусу.



**Рис.2. Симптоми вірусної інфекції на рослинах, оброблених бактеріями та уражених ВТМ**

1 – вірусний контроль, 2 – ЕМ +вірус, 3 – *Lactobacterium plantarum* + вірус

Спостереження за рослинами, обробленими *Pantoea agglomerans* та ураженими вірусом, показали уповільнення розвитку симптоматики вірусної інфекції порівняно з іншими дослідними рослинами (симптоми спостерігали, але вони були менш яскравими і чіткими порівняно з рослинами, ураженими лише вірусом). Крім того, рослини, оброблені цією бактерією, дещо випереджали у рості вірусний контроль (рис. 3).



1

2

3

4

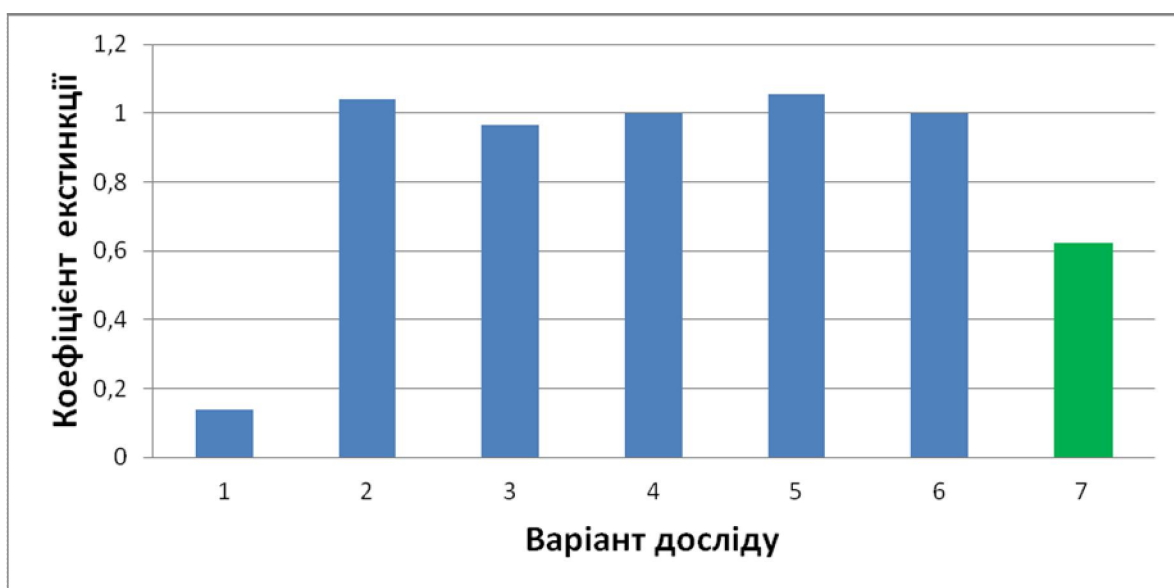
**Рис. 3. Симптоми вірусної інфекції у рослин, оброблених *Pantoea agglomerans* і уражених вірусом**

1 – *Pantoea agglomerans* + вірус ; 2 – вірусний контроль ; 3 – бактеріальний контроль ; 4 – інтактний контроль

Імуноферментний аналіз, що мав підтвердити отримані результати, виявив майже однакову концентрацію вірусу у досліджуваних рослин, оброблених препаратом ЕМ, *Lactobacterium plantarum*, *Methilobacterium radiotolerans* ІМБГ

290 та 65 *Pseudomonas sp.* ІМБГ 294 порівняно із вірусним контролем. У рослин, оброблених *Pantoea aglomerans*, порівняно із вірусним контролем спостерігали зменшення кількості вірусу на  $41 \pm 5,3\%$ . Це свідчить про уповільнення розвитку вірусної інфекції.

За даними ІФА побудовано діаграму, яка із статистичною імовірністю в 0,1 від середнього значення екстинкції для кожного із зразків демонструє отримані результати (рис. 4).



**Рис. 4. Вміст ВТМ у рослинах, оброблених ендofітними бактеріями**

1 – інтактні рослини; 2 – вірусний контроль; 3 – препарат ЕМ + вірус; 4 – *Lactobacterium plantarum* + вірус; 5 – *Methilobacterium radiotolerans* + вірус; 6 – *Methilobacterium radiotolerans* + вірус; 7 – *Pantoea aglomerans* + вірус

Як видно з діаграми, кількість вірусу у рослин, оброблених ендofітними бактеріями, крім *Pantoea aglomerans*, майже така сама, як у вірусному контролі. Разом з тим, було показано, що у рослин, оброблених *Pantoea aglomerans*, спостерігали зниження вмісту вірусного антигена. Це також позитивно корелює і з результатами візуальної діагностики. Отже, можна припустити, що ця ендofітна бактерія справляє праймуючий вплив на рослинний організм, а



обробка на стадії насіння та перед інокуляцією призводить до пригнічення розвитку вірусної інфекції у модельній системі *Nicotiana tabacum* - вірус тютюнової мозаїки.

### Висновки

Досліджено вплив ендofітних бактерій на розвиток інфекції у модельній системі ВТМ – *Nicotiana tabacum*. Бактерії *Lactobacterium plantarum*, *Methilobacterium radiotolerans* ІМБГ 290, №65 *Pseudomonas sp.* ІМБГ 294 та консорціум ЕМ не пригнічували розвиток вірусної інфекції. Бактерія *Pantoea agglomerans* стимулювала ріст рослин тютюну і зумовлювала ефект зменшення кількості вірусу у рослин на 41 ( $\pm 5,3$ ) %. Механізм дії *Pantoea agglomerans* швидше за все пов'язаний з активацією захисної відповіді рослин. Таким чином, ця бактерія є перспективною для подальших досліджень.

### Список літератури

1. Помазков Ю.И. Биологическая защита растений (краткий курс). Для студентов III курса специальности «Агрохимия» / Ю.И. Помазков, В.Г. Заец– М.: РУДН, 1997. – 116с.
2. Овчаренко Л.П. Метагеномний аналіз організмів довкілля / Н.О. Козировська – Київ: Спринт Принт, 2008. – с.193-202.
3. Бронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений. А.М. Бронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №10. – с. 25 – 31.
4. Crowther J. ELISA. Theory and practice Humana Press, N.Y. – 1995. - P.38-39.
5. Антитела 1. Методы / Под ред. Кэти Д.- М: Мир, 1991а. – С. 68-92.
6. Антитела 2. Методы / Под ред. Кэти Д.- М: Мир, 1991b. – С.152-165.

**РАЗВИТИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ  
«Nicotiana tabacum – ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ» ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ**

*Рыбцкая А.М., Харина А.В., Козировская Н.О.*

Изложены результаты исследования влияния эндофитных бактерий на развитие вирусной инфекции в модельной системе «Nicotiana tabacum – вирус табачной мозаики». Показано, что обработка эндофитной бактерией *Pantoea agglomerans* приводит к снижению содержания вирусного антигена на  $41(\pm 5,3)\%$  в растительном материале и подавлению развития фитовирусной инфекции.

*Ключевые слова:* Эндофитные бактерии, вирус табачной мозаики, фитопатогены

**DEVELOPMENT OF VIRAL INFECTION IN MODEL SYSTEM  
'Nicotiana tabacum – TOBACCO MOSAIC VIRUS' UNDER THE  
UNFLUEBCE OF ENDOPHYTIC BACTERIA**

*Anastasiia Rybytska, Alla Kharina, Nataliia Kozyrovska*

We present a study of endophytic bacteria influence on the development of viral infection in model system 'Nicotiana tabacum – Tobacco Mosaic Virus'. It has been shown that application of endophytic bacteria *Pantoea agglomerans* causes a  $41 \pm 5,3\%$  decrease of viral antigen contents in plant tissues, and suppression of phytoviral infection.

*Key words:* Endophytic bacteria, Tobacco Mosaic Virus, phytopatogens