

## МІКРОБІОЛОГІЯ

---

---

УДК 579.262.576.6

### ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ХОЛОДНОГО ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭНДОФИТНЫХ СООБЩЕСТВ БАМБУКА *IN SITU*

© 2011 г. Е. В. Мошинец<sup>1</sup>, С. П. Шпилевая<sup>1</sup>, И. В. Косаковская<sup>2</sup>,  
В. А. Кордюм<sup>1</sup>, Г. Поттерс<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины  
(Киев, Украина)

<sup>2</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины  
(Киев, Украина)

<sup>3</sup>Университет г. Антверпен  
(Антверпен, Бельгия)

За последние 20 лет получено значительное количество данных, свидетельствующих о взаимодействии эндофитов с растениями. Однако, цито- и физиолого-экологические особенности микробно-растительных взаимоотношений в эндосфере, непосредственное взаимодействие микроорганизмов с тканями растений и пространственная архитектура таких взаимодействий остаются малоизученными. С целью исследования растительно-микробных взаимоотношений и определения микроорганизмов эндосферы бамбука *Phyllostachys atrovaginata* нами был адаптирован и применён модифицированный метод стёкол образаний Холодного. В результате выявлены *in situ* эндофитные микробные сообщества бамбука. На конфокальном микроскопе проведен их цитохимический анализ. Применение метода электронной сканирующей микроскопии позволило выявить в тканях побегов бамбуков колонии эндофитов.

**Ключевые слова:** *Phyllostachys atrovaginata*, эндофитные микробные сообщества, микробно-растительные взаимодействия, цитозология

Существование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов характеризуется комплексом разнообразных взаимодействий. Эндофитные микроорганизмы, наряду с ризосферной и филосферной микрофлорой, являются постоянными спутниками растений в их естественной среде обитания (Comrants et al., 2005; Comrants et al., 2009; Мошинец, Косаковская, 2010). К эндофитам относят непатогенные микроорганизмы, колонизирующие внутренние ткани растения (Schulz, Boyle, 2006). Основным источником эндофлоры явля-

ется ризосфера, хотя некоторые эндофиты могут находиться в семенах и при прорастании колонизировать растение (Weyens et al., 2009). В отличие от микроорганизмов ризосферы и филосферы, эндофитные микроорганизмы более тесно взаимодействуют с растением-хозяином. При этом растение предоставляет среду обитания, а эндофиты прямо и косвенно стимулируют рост и развитие растения (Mastretta et al., 2009).

В последнее десятилетие появились работы, указывающие на возможность и перспективу применения эндофитов в аграрных и фиторемедиационных технологиях (Siciliano et al., 2001; Van Aken et al., 2004; Moore et al., 2006). Установлено, что бамбук хорошо растет в

---

Адрес для корреспонденции: Косаковская Ирина Васильевна, Институт ботаники НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина;  
e-mail: science@botany.kiev.ua

условиях умеренного климата (Potters et al., 2009; Potters et al., 2010) и способен активно поглощать тяжелые металлы из почв, превосходя такие популярные в фиторемедиационных мероприятиях растения, как тополь и ива (Vervaeke et al., 2003; Laureysens et al., 2005; Potters et al., 2009). В то же время эндофиты бамбука мало изучены, а об их функциональной активности в тканях растения практически ничего не известно (Han et al., 2009).

Установлено, что функциональная активность эндофитов внутри микробного сообщества определяется как многообразием клеточных взаимодействий (Dworkin, 1991), так и гетерогенностью архитектуры сообщества на структурном и химическом уровнях (Caldwell et al., 1992; Costerton et al., 1994; Massol-Deya, 1995). Классические методические подходы, такие как культивирование и метагеномный анализ (анализ нуклеотидного состава пула участков генов 16S рРНК), являются разрушительными, поэтому не дают информации о пространственном расположении микроорганизмов. Лабораторное культивирование не позволяет определить численный состав популяции (Ward et al., 1992; 1993; 1994). Изучение морфологических, физиологических и биохимических характеристик микроорганизмов методом культивирования в лабораторных условиях также не даёт достоверных результатов (Deretic et al., 1994; Caldwell et al., 1997). Метагеномный анализ позволяет определить только те микроорганизмы, ближайшие родственные штаммы которых культивированы ранее, а нуклеотидные последовательности их рРНК изучены и внесены в базу данных (Овчаренко, Козировская, 2008). Кроме того, выделение всего пула ДНК имеет ряд методических трудностей и не является исчерпывающим, а значит, часть ДНК будет недоступна для анализа (Steffan et al., 1988; Leff et al., 1995).

Для изучения эколого-цитологических аспектов сосуществования эндофитов и бамбука *Phyllostachys atrovaginata* был применён модифицированный нами метод стёкол обрастаний Холодного (Кордюм и др., 2008). Метод основан на применении химически чистых стёкол, которые помещают в природный субстрат на время, в течение которого микроорганизмы субстрата нарастают на стекло, формируя микробный пейзаж. В дальнейшем он изучается с помощью различных микроскопических техник (Cholodny, 1934).

Целью нашей работы было оценить возможность применения модифицированного метода стёкол обрастаний Холодного для выявления эндофитных микробных сообществ взрослых растений бамбука *P. atrovaginata* в условиях *in situ*.

## МЕТОДИКА

Исследования проводились с 6-месячными растениями бамбука *P. atrovaginata*, полученными методом микроразмножения и произрастающими в субстрате для выращивания растений (Bamboo Select® (<http://eng.bambooselect.com/>), Бельгия).

Для морфологического и цитохимического анализа эндофитных сообществ бамбука использовался модифицированный метод «стёкол обрастаний Холодного» (Кордюм и др., 2008). Аналогом стекла в данной модификации являлись плёнки из полиэтилентетрафталата толщиной 40 мкм, шириной до 5 мм, длиной 3 см. В плёнке делались множественные отверстия, диаметр которых в среднем составлял 0,5 мм, расстояние между отверстиями – до 1 мм. Плёнки стерилизовались в 70% этиловом спирте в течение 5 мин. Поверхность бамбука также стерилизовалась 70% этиловым спиртом. Каждая плёнка помещалась в щель ствола, сделанную стерильным скальпелем, после чего ствол в области щели дополнительно стерилизовался 70% этиловым спиртом и стягивался стерильным биндом из нескольких слоев. На один ствол приходилось до трех плёнок, в зависимости от толщины ствола. Экспозиция плёнок в бамбуке продолжалась 4 месяца и проводилась в лаборатории в условиях естественного солнечного освещения. По окончании эксперимента стволы бамбука с плёнками срезались (рис. 1а). Срезанные кусочки бамбука с плёнками внутри хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для последующего анализа плёнки вынимались из бамбука таким образом, чтобы не повредить их поверхность. Плёнки фиксировались в парах 37% формалина в течение 30 мин. Для цитохимического анализа – визуализации молекул нуклеиновых кислот – использовались красители: этидиум бромид (ЭБ), водный раствор 2 мкг/мл, окрашивание 2-5 мин при комнатной температуре (возбуждение – 488 нм, люминесценция – 560 нм); платиновый сайбрин (СГ), водный раствор с концентрацией 0,5 мкг/мл, окрашивание 2-5 минут при комнатной температуре (возбуждение – 497 нм, люминесценция – 520 нм); тиазин ред R (TPR) исполь-

## ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ХОЛОДНОГО

зовался как специфическая окраска для пептидной связи, водный раствор с концентрацией 0,5 мкг/мл, окрашивание в течение 2-5 мин (возбуждение – 510 нм, люминесценция – 580 нм). Для полицитохимической окраски препарат окрашивали последовательно соответствующими красителями. Красители для комбинирования подбирались таким образом, чтобы спектры возбуждения и эмиссии можно было разделять и достоверно анализировать. Акридиновый оранжевый (АО), обладающий ограниченной специфичностью, использовался для получения общей морфологической картины, водный раствор с концентрацией 5 мкг/мл, окрашивание в течение 5 мин (возбуждение – 488, люминесценция – 560 нм). Предупреждение выгорания препарата обеспечивалось антибликовым реагентом – фенилендиамин тетраацетатом, раствор готовился на PBS с pH 7-8 в соотношении 1 мг реактива на 100 мл буфера с добавлением в раствор глицерина (Johnson et al., 1982).

Морфологический анализ срезов ствола бамбука проводили методом электронной микроскопии для чего ткани фиксировались в парах 37% формалина, высушивались, на образцы напылялось золото.

Для структурного и цитохимического анализа эндофитных микробных сообществ использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (КЛСМ) ZEISS AXIOSCOPE-2 Plus с программным обеспечением LSM 5 PASCAL. Предварительно эффективность окраски препаратов проверялась на люминесцентном микроскопе ЛМ-2 (ЛОМО, Россия). Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) плёнок обрастания и тканей растений проводилась на микроскопах Jeol JSM 35C и Jeol JSM 6060LA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

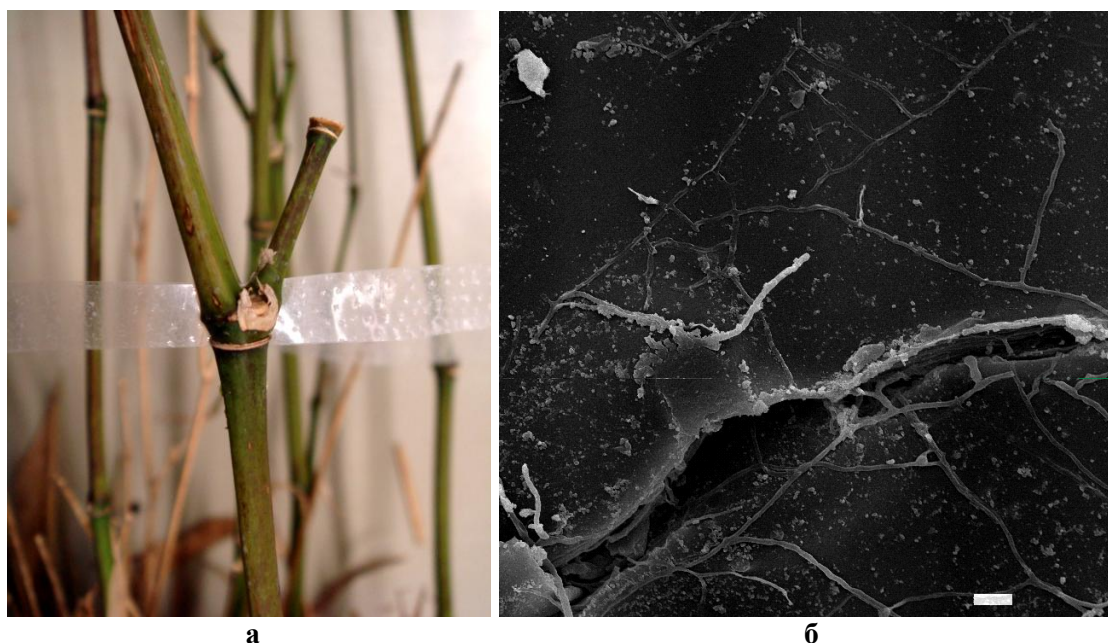
Объектом исследований служили взрослые растения бамбука *Phyllostachys atrovaginata* и их эндофитная микрофлора. В данной работе под термином «эндофитная микрофлора» мы подразумеваем эндогенную микрофлору фенотипически здоровых растений. В параллельных экспериментах с молодыми растениями нескольких видов подсемейства *Bambusoideae* нами были идентифицированы эндофитные бактерии, как культивируемые, так и некультивируемые на применяемых нами питательных средах. Но для цитозекологического анализа пространственных структурных взаи-

модействий клеток эндофитов с клетками тканей растения видового состава эндофитных микроорганизмов недостаточно (O'Donnell et al., 2007; Compant et al., 2009). С целью получения новых данных о характере взаимоотношений между клетками растения и его эндофитами и осуществления цитологического анализа структурных взаимодействий эндофитов и бамбука *P. atrovaginata* нами был адаптирован для растительных тканей и применён модифицированный метод стекол обрастания Холодного. Этот метод уже был нами успешно применён для изучения архитектуры микробных сообществ почвы и ризосферы (Кордюм и др., 2008; Мошинец та ін., 2010). Для исследования эндофитов растений использовались плёнки, имеющие отверстия для газообмена и обмена жидкостями между разделёнными тканями. Эти отверстия в ходе экспозиции обрастали эндофитными микроорганизмами, что свидетельствовало об эффективном функционировании такой системы (рис. 1б).

В данной работе исследовалась принципиальная возможность применения модифицированного метода Холодного для изучения как архитектуры микробных ценозов, сформированных на поверхностях плёнок после четырёхмесячной экспозиции внутри стволов взрослых растений, так и микробных ценозов, образовавшихся в тканях бамбука.

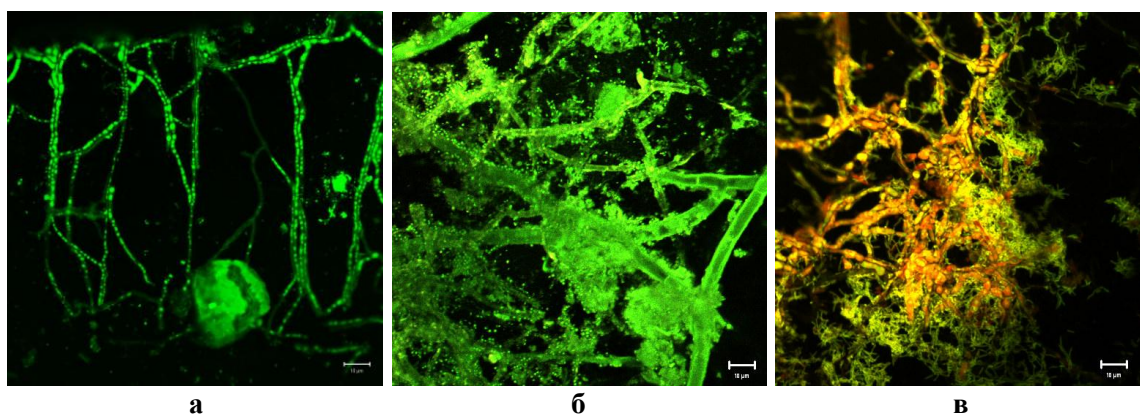
Для изучения архитектуры микробных ценозов применяли методы конфокальной лазерной сканирующей и электронной сканирующей микроскопии. Использование одного или двух красителей одновременно позволило анализировать архитектуру бактериальных группирований и их пространственное расположение в микроэколонии, а также провести цитохимический анализ *in situ* (Assmus et al., 1995; Ghiorse et al., 1996; Moller et al., 1996; Lawrence et al., 1998).

Для анализа эндофитов плёнки закладывали в трёх местах: в нижней части растения – на уровне второго узла, между вторым и третьим узлом и в верхней части – между пятым и шестым узлами. При сравнении архитектуры микробных пейзажей разных участков растения наблюдали большее количество микроорганизмов в зоне второго и третьего узла по сравнению с верхней частью побега. Характерными чертами микробных обрастаний в целом было отсутствие слизистых чехлов, подобных тем, которые часто встречаются в микробных ценозах почв (Кордюм, 2009). Тем не менее, от-



**Рис. 1. Плёнка в стволе бамбука.**

а – плёнка в щели ствола; б – отверстие в плёнке, обросшее гифами. Сканирующая электронная микроскопия, масштаб – 10 мкм.



**Рис. 2. Эндофитные микроорганизмы нижней части ствола бамбука.**

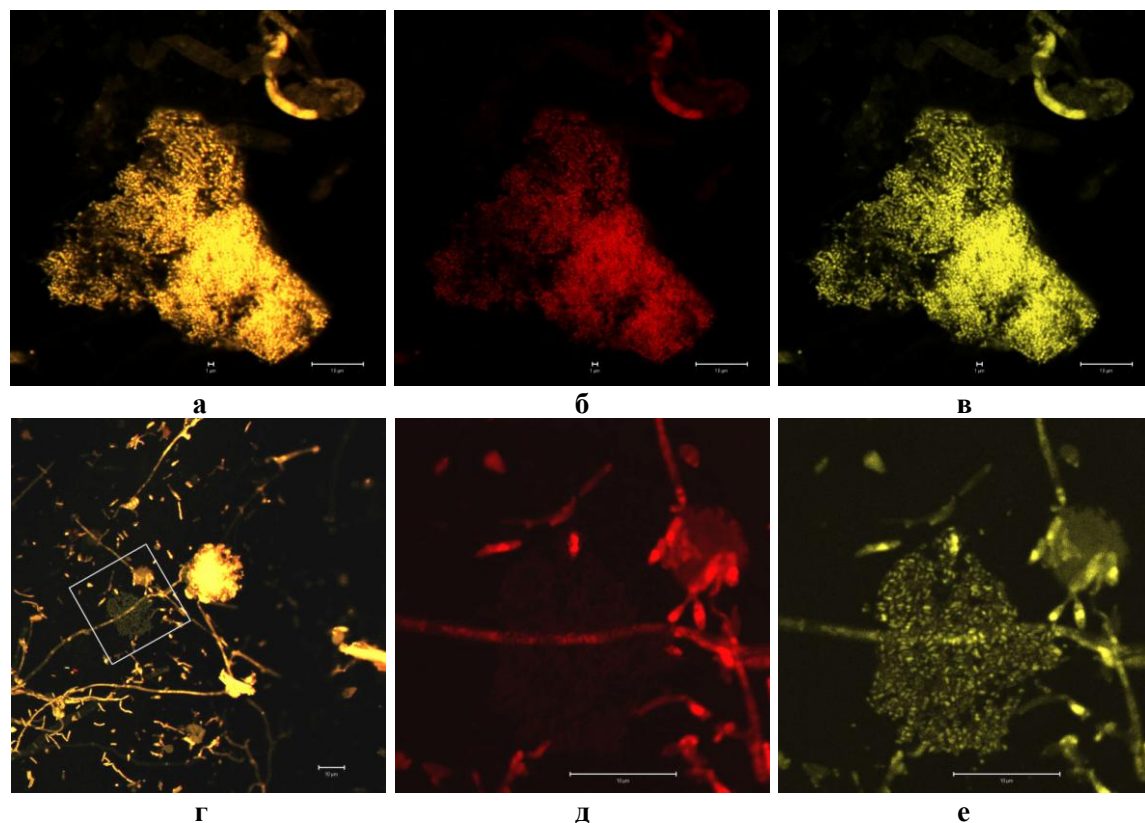
а, б – окраска СГ; в – окраска АО. Конфокальная микроскопия.

дельные участки обрастаний были покрыты слизью, богатой ДНК, о чем свидетельствовала цитохимическая реакция при применении СГ и ЭБ – специфических реагентов для выявления ДНК (рис. 2а).

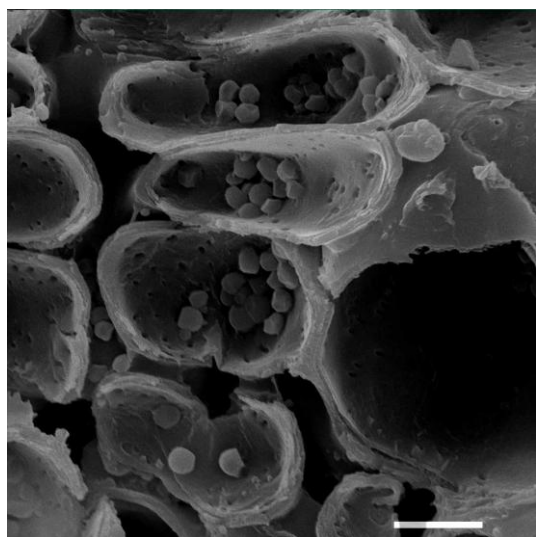
Микроценозы нижней части побега были представлены преимущественно гифами грибов в ассоциации с бактериями, хотя встречались и отдельные гифы. В нижней части побегов наблюдались три морфотипа гифов. На рис. 2а представлен пример первого морфотипа – тонкие гифы, до 2 мкм шириной, формирующие толстые сосредоточения. Благодаря цитохимическому окрашиванию СГ видно, что эти сосредоточения покрыты слизью, содержащей

сравнительно небольшое количество ДНК. Такие гифы, как правило, не были ассоциированы с бактериями. Второй морфотип, наблюдающийся в нижней части побегов, представлен толстыми, до 7 мкм шириной гифами, находящимися в ассоциации с бактериями (рис. 2б). Сопутствующие бактерии – мелкие, размером до 1 мкм, имели кокковидную форму. Бактерии располагались вдоль гифов, что объясняется высокой влажностью в месте экспозиции данного участка плёнки. Третий морфотип представлен толстыми септированными гифами, находящимися в тесной ассоциации с палочковидными бактериями (рис. 2в).





**Рис. 3. Эндофитные микроорганизмы верхней части ствола бамбука.**  
а, б – окраска EB+TPR; в, г – окраска EB; д, е – окраска TPR. Конфокальная микроскопия.

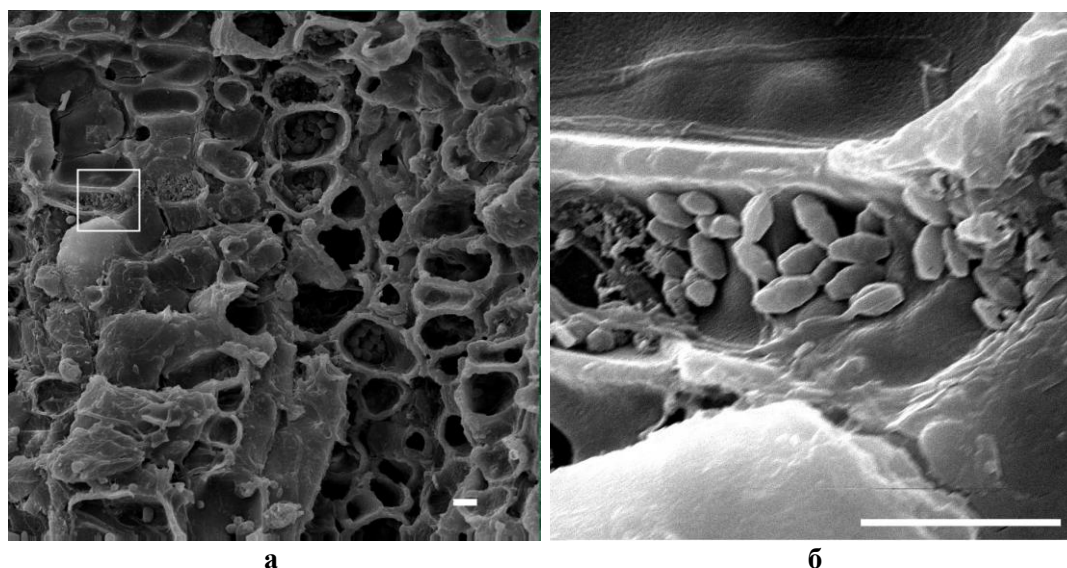


**Рис. 4. Споры эндофитных грибов в тканях ствола бамбука.**  
Сканирующая электронная микроскопия, масштаб – 10 мкм.

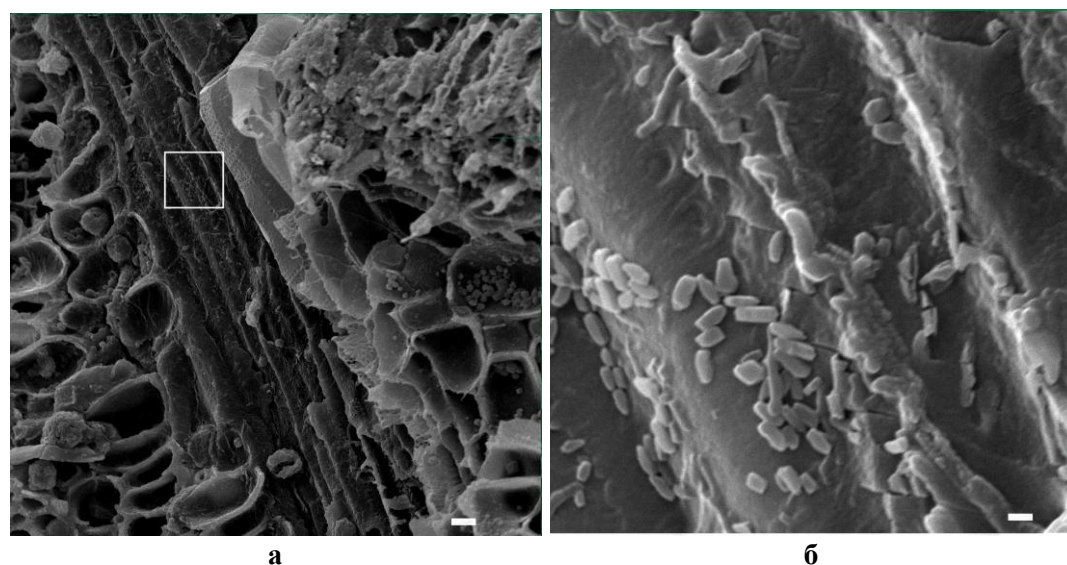
В отличие от микрофлоры нижней части побега, в верхней части рост микроорганизмов наблюдался редко. Преимущественно выявлены гифы по морфологии близкие к вышеописанному третьему морфотипу, а также колонии мелких бактерий, размером от 0,5 мкм и мень-

ше. Такие колонии часто находились в ассоциации с гифами и не имели слизистых чехлов. Отдельные микроорганизмы характеризовались высокой метаболической активностью, о чём свидетельствовала интенсивная окраска TPR, обусловленная высокой концентрацией белка в клетках (рис. 3а-в). Отсутствие окраски ЭБ свидетельствует о малом количестве нуклеиновых кислот в клетках, что сопровождается снижением уровня метаболизма (рис. 3г-е). Исходя из этого, наблюдаемые микроорганизмы можно отнести к экологической форме бактерий LNA (от low nucleic acid, низкий уровень нуклеиновых кислот). Такая форма альтернативна экологической форме с обычным количеством ДНК – HNA (от high nucleic acid, высокий уровень нуклеиновых кислот). Установлено, что LNA форма жизнеспособна и может быть культивируемой (Servais et al., 2003; Longnecker et al., 2005).

При изучении тканей ствола бамбука в местах разрезов и экспозиции плёнок в месте разреза побега были обнаружены гифы грибов, расположенные на поверхности нескольких сосудов. В паренхимных клетках ствола выявлены споры грибов, тогда как количество гиф было сравнительно невысоким (рис. 4). Количе-



**Рис. 5. Эндофитные бактерии в тканях ствола бамбука.**  
Сканирующая электронная микроскопия, масштаб – 10 мкм.



**Рис. 6. Эндофитные бактерии в тканях ствола бамбука.**  
Сканирующая электронная микроскопия, масштаб – слева – 10 мкм, справа – 1 мкм.

ство спор в клетках бамбука коррелировало с количеством гиф на плёнке. Другие участки плёнки, экспонировавшейся в стволе бамбуке, содержали меньшее число гиф. На самой же плёнке спор обнаружено мало.

В тканях бамбука эндофитные бактерии встречались реже, чем споры грибов. Бактерии имели бациллярную форму, располагались колониями в межклеточных пространствах (рис. 5) и сосудах (рис. 6) тканей стволов бамбука.

В результате применения модифицированного метода Холодного в тканях побегов бамбука *P. atrovaginata* выявлены ассоциации, образованные гифами грибов и колониями бак-

терий. Микрофлора нижней части побегов оказалась довольно многочисленной и разнообразной, тогда как микрофлора верхней части была значительно беднее. В микрофлоре верхней части побегов обнаружены бактерии, относящиеся к LNA-формам. Колонии эндофитных бактерий выявлены в межклеточных пространствах и в сосудах тканей побегов. Гифов грибов в тканях побега обнаружено сравнительно немного, в то время как споры грибов, расположенные в паренхимных клетках, встречались значительно чаще. Таким образом, модифицированный нами метод стёкол обрастаний Холодного был успешно применён для наблюдения и анализа архитектуры микроценозов эндофитов в усло-

## ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ХОЛОДНОГО

виях *in situ* и может быть рекомендован для изучения цитозекологических аспектов сосуществования эндофитных микроорганизмов и тканей растений. В перспективе модифицированный метод Холодного может быть комбинирован с современными молекулярно-генетическими методами, что существенно расширит информативность такого подхода в изучении растительно-микробных взаимоотношений.

### ЛИТЕРАТУРА

- Кордюм В.А., Мошинец Е.В. Биополимеры и клетки на уровне микробной архитектуры. 2. Параллельная жизнь, параллельная, но не жизнь, не параллельная, и не жизнь, а что? Что есть жизнь? // *Biopolym. Cell.* – 2009. – V. 25. – P. 403-423.
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 1. Структурно-функціональна характеристика ризо-, ендота фітосфери // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2010. – Вип. 2 (20). – С. 19-36.
- Мошинець О.В., Штильова С.П., Снайрс Е.Д., Косаківська І.В. Фітосфера *Brassica napus* L. як ніша для *Pseudomonas fluorescens* SBW25 // Доп. НАН України. – 2010. – № 12. – С. 150-153.
- Овчаренко Л.П., Козирівська Н.О. Метагеномний аналіз мікроорганізмів довкілля. – К.: Спринт Принт, 2008. – 256 с.
- Assmus B., Hutzler P., Kirchoff G. et al. *In situ* localization of *Azospirillum brasiliense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61. – P. 1013-1019.
- Caldwell D.E., Korber D.R., Lawrence J.R. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology // *Adv. Microb. Ecol.* – 1992. – V. 12. – P. 1-67.
- Caldwell D.E., Wolfaardt G.M., Korber D.R. Do bacterial communities transcend Darwinism? // *Adv. Microb. Ecol.* – 1997. – V. 15. – P. 105-191.
- Cholodny N.G. A soil chamber as a method for the microscopic study of the soil microflora // *Arch. Microbiol.* – 1934. – V. 5. – P. 148-156.
- Compant S., Duffy B., Nowak J. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 4951-4959.
- Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biol. Biochem.* – 2009. – V. 42. – P. 669-678.
- Costerton, J.W., Lewandowski Z., De Beer D. et al. Biofilms: the customized microniche // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176. – P. 2137-2142.
- Deretic V., Schurr M.J., Boucher J.C., Martin D.W. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors // *J. Bacteriol.* – 1994. – V. 176. – P. 2773-2780.
- Dworkin M. Introduction // *Microbial cell-cell interactions.* – Washington: Am. Soc. Microbiol., D.C., 1991. – P. 1-6.
- Ghiorse W.C., Miller D.N., Sandoli R.L., Siering P.L. Applications of laser scanning microscopy for analysis of aquatic microhabitats // *Microsc. Res. Tech.* – 1996. – V. 33. – P. 73-86.
- Han J., Xia D., Li L. et al. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) // *Microb. Ecol.* – 2009. – V. 58. – P. 363-373.
- Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C. et al. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy // *J. Immunol. Methods.* – 1982. – V. 55. – P. 231-242.
- Laureysens I., Temmerman L., De Hastir T. et al. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a polar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential // *Environ. Poll.* – 2005. – V. 133. – P. 541-551.
- Lawrence J.R., Wolfaardt G.M., Neu T.R. The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy // Digital image analysis of microbes – imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications. / Eds. M.H.F. Wilkinson, F. Schut. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1998. – P. 431-465.
- Leff L.G., Dana J.R., McArthur V., Shimkets L.J. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61. – P. 1141-1143.
- Longnecker K., Sherr B.F., Sherr E.B. Activity and phylogenetic diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content and electron transport system activity in an upwelling ecosystem // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 7737-7749.
- Massol-Deya A.A., Whallon J., Hickey R.F., Tiedje J.M. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61. – P. 769-777.
- Mastretta C., Taghavi S., Van der Lelie D. et al. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce Cd phytotoxicity // *Int. J. Phytoremediation.* – 2009. – V. 11. – P. 251-267.

- Moller S., Pedersen A.R., Poulsen L.K. et al.* Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62. – P. 4632-4640.
- Moore F.P., Barac T., Borremans B. et al.* Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2006. – V. 29. – P. 539-556.
- O'Donnel A.G., Young I.M., Rushton S.P. et al.* Visualization, modeling and prediction in soil microbiology // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 5. – P. 689-699.
- Potters G., Brems A., Valcke R. et al.* Energy crops in Western Europe: is bamboo an acceptable alternative? // VIII World Bamboo Congress Proceedings (Bangkok, Thailand, 16-18 September, 2009). – Bangkok, 2009. – P. 22-34.
- Potters G., Schoeters G., Tytgat T. et al.* Pyrolysis kinetics of bamboo material // *Renewables from Biomass and Waste.* – 2010. – P. 391-396.
- Schulz B., Boyle C.* What are endophytes? // *Microbial Root Endophytes* / Eds. B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – P. 1-13.
- Servais P., Casamayor E.O., Courties C. et al.* Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2003. – V. 33. – P. 41-51.
- Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc A. et al.* Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 2469-2475.
- Steffan R.J., Goksoyr J., Bej A.K., Atlas R.M.* Recovery of DNA from soil and sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – V. 54. – P. 2908-2915.
- Van Aken B., Peres C.M., Doty S.L. et al.* *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from polar trees (*Populus deltoids* X *nigra* DN34) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – V. 54. – P. 1191-1196.
- Vervaeke P., Luyssaert S., Mertens J. et al.* Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial // *Environ. Poll.* – 2003. – V. 126. – P. 275-282.
- Wagner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K.H.* Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59. – P. 1520-1525.
- Wagner M., Erhart R., Manz W. et al.* Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – V. 60. – P. 792-800.
- Ward D.M., Bateson M.M., Weller R., Ruff-Roberts A.L.* Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature // *Adv. Microb. Ecol.* – 1992. – V. 12. – P. 219-286.
- Weyens N., Van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J.* Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2009. – V. 20. – P. 248-254.

Поступила в редакцию  
25.11.2010 г.

## APPLICATION OF A MODIFIED KHOLODNY'S METHOD FOR STUDY OF ENDOPHYTIC COMMUNITIES OF BAMBOO PLANTS *IN SITU*

O. V. Moshynets<sup>1</sup>, S. P. Shpylova<sup>1</sup>, I. V. Kosakivska<sup>2</sup>,  
V. A. Kordium<sup>1</sup>, G. Potters<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)*

<sup>2</sup>*M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Science of Ukraine  
(Kyiv, Ukraine)*

<sup>3</sup>*University of Antwerp  
(Antwerp, Belgium)*

During the last twenty years, a lot of knowledge on plant-endophytic interactions has been unveiled. Despite this renewed interest on the subject, there is still a lack of detailed information on cytoecological and physiological features of plant-microbial interactions in the endosphere. More specifically, there is a need for knowledge on the interactions between microbial cells and plant



## **ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ХОЛОДНОГО**

tissues in terms of their spatial architecture. In order to study plant-microbial interactions and detect endospheric microorganisms of bamboo plants, Cholodny's method of using glass pieces has been adapted. Using this methodology, endophytic microbial communities of bamboo *Phyllostachys atrovaginata* have been detected in situ, and were analysed by cytochemical means. Endophytes were also detected in bamboo stem tissues via SEM.

**Key words:** *Phyllostachys atrovaginata*, endophytic microbial communities, plant-microbial interactions, cytoecology

## **ЗАСТОСУВАННЯ МОДИФІКОВАНОГО МЕТОДУ ХОЛОДНОГО ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЕНДОФІТНИХ СПІЛЬНОТ БАМБУКА *IN SITU***

О. В. Мошинець<sup>1</sup>, С. П. Шпильова<sup>1</sup>, І. В. Косаківська<sup>2</sup>,  
В. А. Кордюм<sup>1</sup>, Г. Потерс<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України  
(Київ, Україна)

<sup>2</sup>Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України  
(Київ, Україна)

<sup>3</sup>Університет м. Антверпена  
(Антверпен, Бельгія)

За останні 20 років отримано значну кількість даних про взаємодію ендوفітів з рослинами. Але, цито- та фізіолого-екологічні особливості мікробно-рослинних взаємодій в ендосфері, безпосередня взаємодія мікроорганізмів з тканинами рослин і просторова архітектура цих взаємодій залишаються недостатньо вивченими. З метою дослідження рослинно-мікробних взаємовідносин та визначення мікроорганізмів ендосфери бамбука *Phyllostachys atrovaginata* нами було адаптовано та застосовано метод скелець обростання Холодного. В результаті виявлені *in situ* ендوفітні мікробні спільноти бамбука. На конфокальному мікроскопі проведено їхній цитохімічний аналіз. Шляхом застосування методу скануючої електронної мікроскопії в тканинах пагонів бамбуків було знайдено колонії ендوفітів.

**Ключові слова:** *Phyllostachys atrovaginata*, ендوفітні мікробні спільноти, мікробно-рослинні взаємодії, цитоекологія