Detection and primary characterization of *Rothia amarae* in a suspension culture of *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) cells

Sokolov A.O., Dykman L.A., Galitskaya A.A., Sokolov O.I.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: sokolov_a@ibppm.ru

Key message. The presence of non-pathogenic bacterial microflora in *Arabidopsis thaliana* suspension culture has been shown to coexist latently with plant cells for a long time. According to the results of 16S rRNA sequencing, it was shown that the detected bacteria belong to the species *Rothia amarae*. Using microbiological, microscopic and immunochemical methods, the correspondence of the obtained strain to the species *Rothia amarae* was also confirmed.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, plant cell suspension culture, bacteria

Arabidopsis thaliana is a model plant used commonly in genetic and molecular-biological research. In the standard maintenance of an *A. thaliana* suspension culture, transfers are made every 10 days, with no visual signs of bacterial or other contamination being observed. However, when growth is extended to 20 and more days or when the culture conditions (temperature, aeration, etc.) are disrupted, the medium thickens and gets turbid, and suspended matter appears in the supernatant liquid. This makes it possible to assume that the culture now contains a bacterial microflora.

Here we tested a suspension culture of *A. thaliana* cells for the presence of bacteria. The tests were followed by the identification of the bacteria. A 10-day-old plant cell culture was filtered, and bacteria were isolated by centrifugation. After sedimentation at 3000 g for 10 min, the supernatant liquid was centrifuged again at 20000 g 30 min. The resulted bacterial pellet was identified on the basis of their 16S rRNA sequence by polymerase chain reaction (PCR) by using a set of universal primers. For specific detection of bacteria in a suspension culture of *A. thaliana*, we obtain a rabbit polyclonal antibody. Confocal and electron microscopy, dynamic light scattering, microbiological methods and immunocytochemical methods are also used in the work. We have shown the ability of the bacteria to grow on blood and tryptone-soya agar preserving the morphological and immunochemical properties of the isolate. An isolated bacteria as veritable symbiont of *A. thaliana* suspension culture remains open in communication with plants.

This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 18-04-00469).

Первичная характеристика бактерий *Rothia amarae*, обнаруженных в суспензионной культуре клеток *Arabidopsis thaliana* (Heynh.)

Соколов А.О., Дыкман Л.А., Галицкая А.А., Соколов О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Аннотация. Показано присутствие в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana* непатогенной бактериальной микрофлоры длительное время, латентно сосуществующей с растительными клетками. По результатам секвенирования 16S рРНК показано, что обнаруженные бактерии принадлежат к виду *Rothia amarae*. При помощи микробиологических, микроскопических и иммунохимических методов также подтверждено соответствие полученного штамма виду *Rothia amarae*.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, суспензионная культура растительных клеток, бактерии

Arabidopsis thaliana – модельное растение, широко используемое для проведения генетических и молекулярно-биологических исследований. При стандартном поддержании суспензионной культуры клеток *A. thaliana* пересадка происходит каждые 10 дней. При этом в культуре не выявляется никаких визуальных признаков бактериальных или иных загрязнений. Однако при более длительном культивировании (20 и более суток) или при нарушении условий выращивания (температурный режим, аэрация и др.) среда загущается, мутнеет и в надосадочной жидкости появляется взвесь. Это позволило предположить, что в поддерживаемой культуре может присутствовать бактериальная микрофлора. Целью работы была проверка суспензионной культуры клеток *A. thaliana* на бактериальное присутствие с последующей идентификацией микроорганизмов. Выделение бактерий проводили последовательным центрифугированием суспензии растительных клеток. После осаждения клеток растения при 3000 g 10 мин, полученный супернатант подвергали второму центрифугированию при 20000 g 30 мин. Осадок бактерий подвергали дальнейшему исследованию.

Идентификацию выделенных бактерий проводили методом ПЦР по 16S рРНК с использованием набора универсальных праймеров. Для специфической детекции присутствия бактерий в суспензионной культуре клеток *A. thaliana* были получены кроличьи поликлональные антитела. В работе также использовали конфокальную и электронную микроскопию, метод динамического светорассеяния, микробиологические методы и иммуноцитохимические методы. Выделенные бактерии можно культивировать на кровяном и триптон-соевом агаре с сохранением морфологических и иммунохимических свойств полученного штамма. Является ли выделенная бактерия истинным симбионтом суспензионной культуры *A. thaliana* остается открытым в контексте взаимодействий с растениями.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-04-00469.