

КОРОБКОВА К. С.<sup>✉</sup>, ЗАТОВСЬКА Т. В., ХАРЧУК М. С.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 154

<sup>✉</sup> kkorobkova@ukr.net, (095) 403-67-67

## МІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФІТОПЛАЗМОВОЇ ІНФЕКЦІЇ НА СИМБІОТИЧНУ СИСТЕМУ *MEDICAGO SATIVA* – *RHIZOBIUM MELILOTI* В МОДЕЛЬОВАНИХ УМОВАХ

**Мета.** Метою роботи було дослідити на мікроскопічному рівні особливості взаємодії *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 із рослиною-мішенню *Medicago sativa*, а також визначити роль штамів *Rhizobium meliloti* із природними і дефектними полісахаридами у виникненні опірності рослин. **Методи.** Вирощування рослин і їх інокуляцію бактеріями проводили в умовах мікрореґетаційного досліду. Вивчення ультраструктури ділянок коренів люцерни і бульбочок виконували шляхом світлової і електронної мікроскопії. **Результати.** Ризобійний штам, мутантний за синтезом ліпополісахаридів, частіше утворював на *M. sativa* нетипові бульбочки, які швидше старішали. У варіанті з подвійною інокуляцією люцерни ризобіями разом з ахолеплазмою спостерігалися зміни морфології бічних коренів рослин, а також деформація бульбочок. **Висновки.** Результати проведеного дослідження свідчать не лише про здатність фітоплазм проникати через кореневу систему і мігрувати у надземні органи рослин, а й демонструють можливість їх знаходження у бульбочках, утворених ризобіями.

**Ключові слова:** Mollicutes, ахолеплазма, ризобії, мутант, ліпополісахариди.

Фітопатогенні представники класу *Mollicutes*, а саме *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118, є збудниками мікоплазмозів певних культурних рослин, при цьому можуть спостерігатися нетипові симптоми або їх «маскування» під захворювання іншої етіології [1]. Слід зауважити, що високоефективних специфічних засобів проти збудників фітоплазмозів для сільськогосподарства не існує, що пов'язано із особливостями їх біології. На відміну від більшості бактерій, ці мікроорганізми позбавлені клітинної стінки і не здатні до синтезу її попередників, оскільки їх біосинтетична здатність обмежена. Багато з цих мікроорганізмів також не синтезують жирних кислот, холестерину і

деяких білків, а отримують ці компоненти безпосередньо з середовища, тобто від клітини організму-живителя [1–3].

У зв'язку з прогресуючою останнім часом стійкістю патогенних фітоплазм до антибіотиків і стрімким поширенням фітоплазмозів хвороб дослідники приділяють особливу увагу створенню ефективних засобів стримування інфекцій, що базуються на підвищенні опірності рослини-хазяїна. Раніше було доведено позитивний вплив утворення симбіотичної бобово-ризобійної системи на прояв фітоплазмозів хвороб люцерни в лабораторних умовах [4]. З огляду на те, що у формуванні такого симбіозу важливу роль відіграють поверхневі полісахариди бактерій, доцільно було на мікроскопічному рівні дослідити особливості взаємодії ахолеплазм із рослиною-мішенню, а також визначити роль ризобій із природними і дефектними полісахаридами у виникненні опірності рослин до інфекції фітоплазмами.

### Матеріали і методи

У дослідженнях використано *A. laidlawii* var. *granulum* 118 – збудник блідо-зеленої карликовості пшениці з Національної колекції мікроорганізмів України Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Культивування здійснювали на поживному середовищі СМ ІМВ-72 протягом 72 год за 32 °С [5]. Густина культури становила  $5 \cdot 10^5$  КУО.

Дослідження проводили на високоефективному лабораторному штамі *R. meliloti* СХМ1 – 188 та мутантному штамі Tb29, дефектному за синтезом ліпополісахаридів, який був одержаний від штаму СХМ1 – 188 шляхом Tn5-транспозонового мутагенезу [6]. Бактерії вирощували на живильному середовищі ТУ.

У дослідах використовували насіння люцерни *Medicago sativa* сорту Синюха; для вирощування рослин в умовах мікрореґетації

було використано агаризоване середовище Красільнікова-Кореняко. Бульбочки збирали через 6 тижнів після інокуляції досліджуваними штамми; для світлової мікроскопії напівтонкі зрізи (0,3 – 1мкм) на склі забарвлювали метиленовим синім. Мікроскопічні дослідження бульбочок і коренів рослин виконували за Цигановим (1998).

### Результати та обговорення

У стерильному контрольному варіанті мікрогетатаційного дослідження встановлено, що рослини *M. sativa* без додавання культури ризобій швидко гинули, спостерігався апоптоз клітин їх судинної системи. Додавання у дослід культур ризобій сприяло покращенню фізіологічного стану рослин. У варіанті інокуляції мутантом та інфікування фітоплазмами спостерігалася аналогічна картина. Рослини люцерни, інокульовані мутантом і заражені фітоплазмою, були значно слабшими і швидше старішали, ніж рослини, інокульовані ефективним штамом ризобій.

Обидва штами ризобій утворювали на коренях люцерни бульбочки. Проте бульбочки, утворені за впливу мутанту Тб29, дефектного за синтезом ліпополісахаридів, з'являлися на 7 – 10 днів пізніше, ніж бульбочки високоефективного штаму СХМ1 – 188, та, головним чином,

на бічних корінцях рослин. Вони були дрібними і білими та за виглядом часто нагадували псевдобульбочки, на відміну від видовжених типових бульбочок штаму СХМ1 – 188 *R. meliloti*.

На більш пізніх строках інокуляції на коренях рослин, інокульованих мутантним штамом, виявлялися бульбочки рожевого кольору, які могли бути здатні до азотфіксації, про що свідчив зелений колір рослин люцерни (на відміну від жовтуватих контрольних рослин, не інокульованих ризобіями). Гістологічну зональність бульбочок аналізували через 6 тижнів (рис. 1).

Бульбочки, утворені високоефективним і мутантним штамми *R. meliloti*, мали подібну структурну організацію і містили зону інфекційних ниток (зона II) та зону азотфіксації (зона III). Очевидно, що більшу частину бульбочок, утворених батьківським штамом СХМ1 – 188, займала зона активної азотфіксації, для якої характерна присутність великої кількості видовжених за формою бактероїдів. Відомо, що саме бактероїди здатні відновлювати молекулярний атмосферний азот в амонієвий, який використовується рослинами [8; 9]. Ультраструктура азотфіксуючих бульбочок, утворених штамом СХМ1 – 188 *R. meliloti*, показана на рис. 2 А.

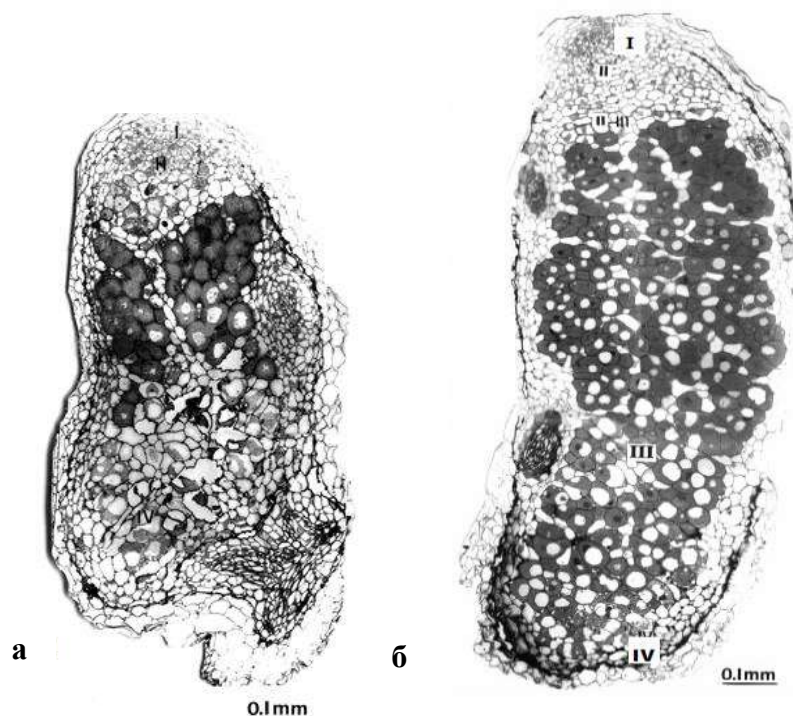


Рис. 1. Гістологічна будова азотфіксуючих бульбочок, утворених *R. meliloti* штамми Тб29 (а) і СХМ1 – 188 (б) на *M. sativa*. I – меристема, II – зона інфекції, III – зона активної азотфіксації, IV – зона старіння.

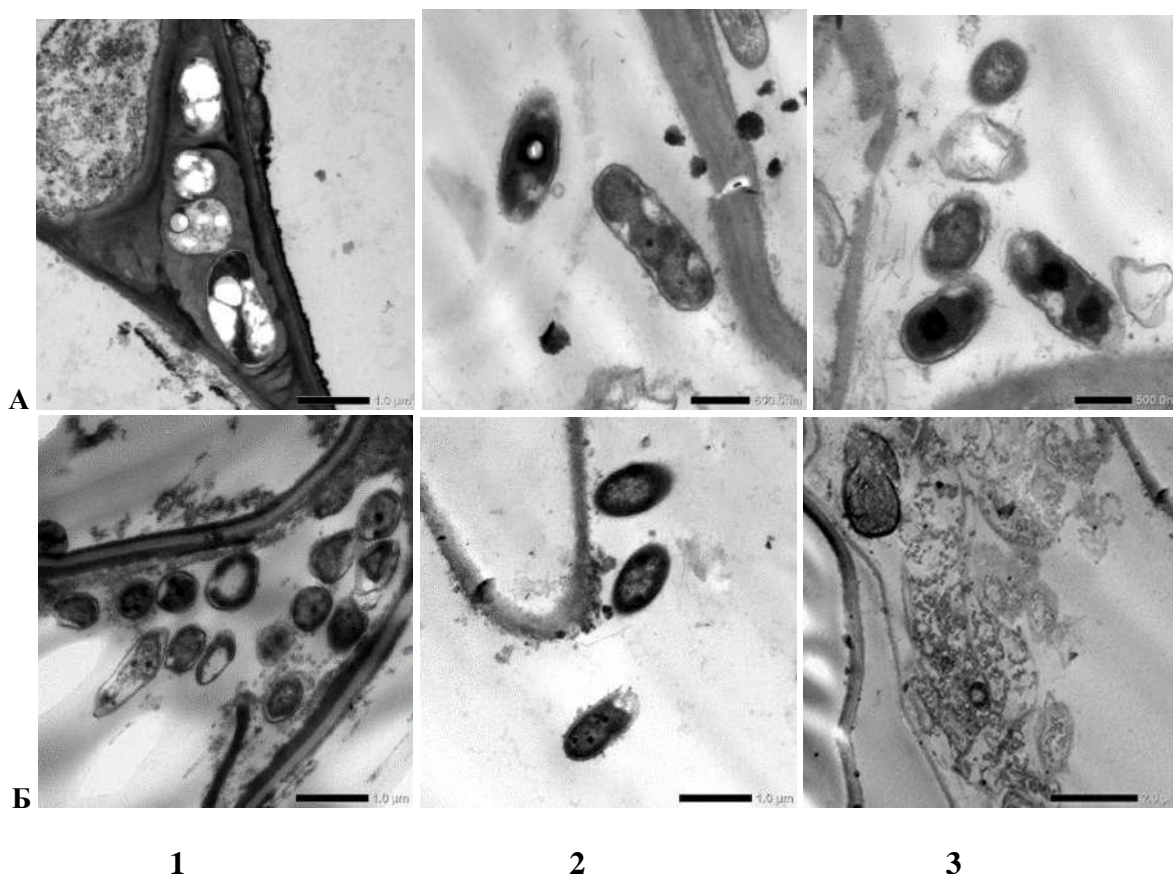


Рис. 2. Ультраструктура бульбочок, утворених штамами *R. meliloti* CXM1 – 188 (А) і Тб29 (Б). Цифрами позначено зони бульбочок: 1 – зона інфекційних ниток; 2 – зона азотфіксації; 3 – зона старіння.

На рис. 2 А–1 представлений фрагмент інфекційної нитки з бактеріями *R. meliloti*. Можна бачити значні накопичення полігидроксипутирату в бактеріальних клітинах, які спостерігаються лише під час перебування бактерій *R. meliloti* в інфекційних нитках, але зникають у бактероїдах. Рис. 2 А–2 – фрагмент зони активної азотфіксації з типовими бактероїдами видовженої форми (без відкладів полігидроксипутирату). Рис. 2 А–3 – на межі зони азотфіксації і зони старіння містяться активні та вже деградовані бактероїди.

У варіанті з мутантом Тб29, дефектним у синтезі ліполісахаридів, гістологічна зональність бульбочок була менш вираженою (рис. 1). Зона азотфіксації (зона III) займала значно меншу частину бульбочок і часто була представлена дуже вакуолізованими рослинними клітинами, які в багатьох випадках містили недиференційовані бактероїди, що мало відрізнялися від бактерій. Натомість переважну частину таких бульбочок займала зона старіння (зона IV). Ультраструктура нетипових бульбочок, утворених

мутантом Тб29, показана на рис. 2 Б. На фото 2 Б–1 – нетипово розширена інфекційна нитка з бактеріальними клітинами. Слід зазначити, що такі розширені інфекційні нитки характерні саме за інокуляції штамами ризобій, дефектними в азотфіксації або синтезі сигнальних полісахаридів. На рис. 2 Б–2 представлені бактероїди. Рис. 2 Б–3 – зона лізису бактероїдів, яка займала більшу частину бульбочок, утворених мутантом.

Під час електронно-мікроскопічного дослідження розширених ділянок коренів люцерни, зараженої *A. laidlawii var. granulum 118*, у дослідних зразках виявлено типові за морфологією й ультраструктурою клітини фітоплазм (рис. 4). У контрольному варіанті такі клітини не знайдені.

Із наукової літератури відомо, що після експериментального інфікування рослин ахолеплазмами ці мікроорганізми проникають у тканини рослин безпосередньо через неушкоджену кореневу систему і спричиняють морфози, характерні для спонтанних фітоплазмозів у природ-

них умовах [1; 4; 10]. У ході вивчення в мікро-вегетаційному досліді варіанта з подвійним інфікуванням люцерни ризобіями разом із фітоплазмою показано, що на бічних коренях рослин, крім деформованих гачкоподібних бульбочок, що відповідає даним літератури [4], після 3 тижнів культивування спостерігалися також потовщення кінчиків, які мали гладку поверхню і аморфну структуру.

У процесі вивчення ультратонких зрізів коренів *M. sativa*, у мікровегетаційному досліді уражених фітоплазмою *A. laidlawii var. granulum 118*, показано, що в результаті інфікування рослин фітоплазмами відбувається прикріплення мікроорганізмів до поверхні рослинної клітини, деформація та інвагінація клітинної стінки рослин. Як у випадку стерильних рослин, так і у випадку інфікованих ризобіями, клітини судинних тканин із відшарованим протопластом були заповнені типовими за морфологією і ультраструктурою клітинами ахолоплазм сферичної, овальної або видовженої форми розміром до 0,3 мкм, невисокої електронної щільності і більш дрібними електронно-щільними структурами (рис. 3; 4). У рослин, інфікованих фітоплазмами, в судинних тканинах спостерігаються

«порожні» клітини; органели характеризуються як нечіткі й видозмінені, що, вірогідно, є наслідком ступеня гідратації цитоплазми і некрозом частини структур. Серед клітин судинних тканин трапляються клітини з протопластом, що відшарувався.

Шляхом електронної мікроскопії бульбочок показано наявність у клітинах інфекційних часток ахолоплазм, частина з яких представлена у вигляді наноформ (міні-тіл) (рис. 5). Вважають, що такі форми фітоплазм утворюються у несприятливих для них умовах внаслідок порушення надходження попередників нуклеїнових кислот у клітини бактерій, не здатних синтезувати ці речовини *de novo* [10].

Колонізація клітин рослин міні-тілами індукує некроз мезофілу, апоптоз клітин флоєми, деструкцію хлорофілу і супроводжується неспецифічними змінами ряду фізіолого-біохімічних показників. Реакції відповіді рослин на фітоплазмові інфекції пов'язані з включенням класичних сигнальних механізмів для пригнічення патогенних мікроорганізмів [1–4]. Проте життєвий цикл фітоплазм і шляхи їх потрапляння всередину бульбочок люцерни ще не з'ясовані і потребують подальших досліджень.

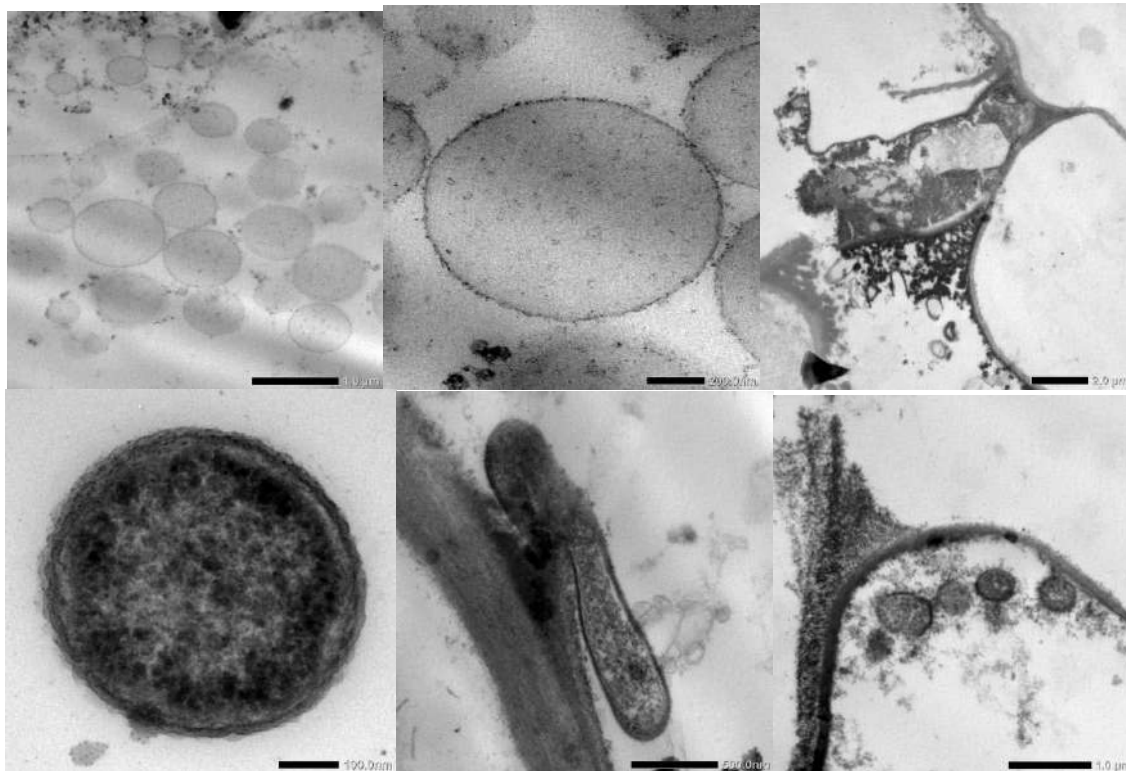


Рис. 3. Ультраструктура ділянки коренів *M. sativa*, уражених *A. laidlawii var. granulum 118*.



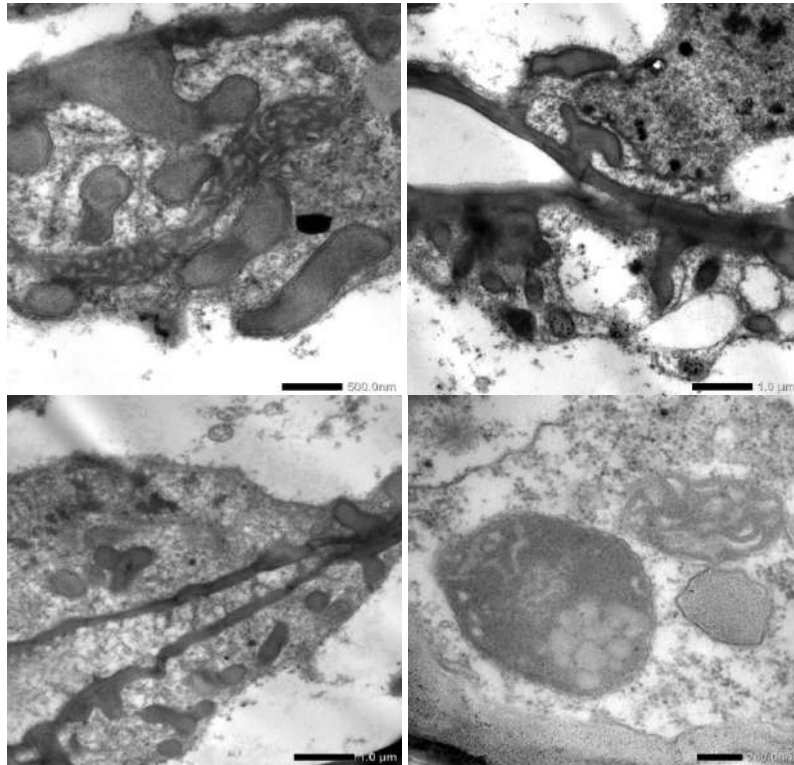


Рис. 4. Ультраструктура клітин коренів *M. sativa*, інюльованих *R. meliloti* CXM1 – 188, із штучним зараженням *A. laidlawii* var. *granulum* 118.

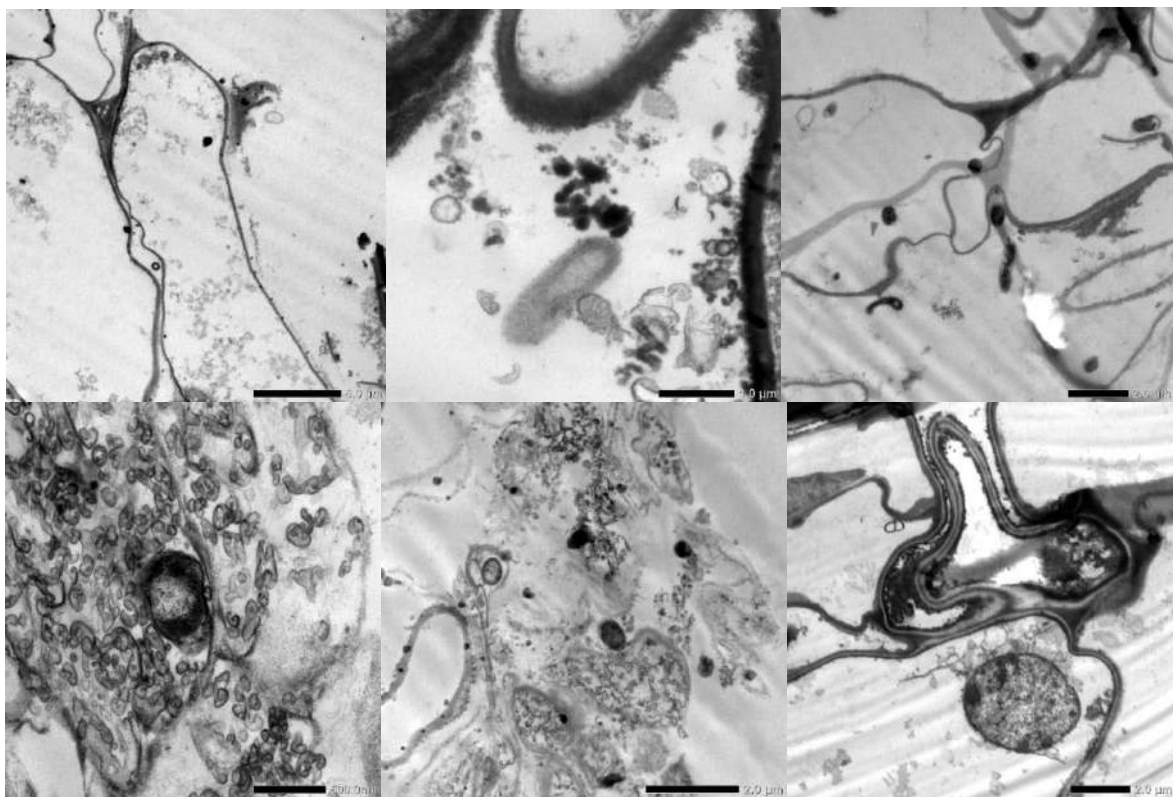


Рис. 5. Ультраструктура азотфіксуючих бульбочок, утворених штамом CXM1 – 188 *R. meliloti* на коренях *M. sativa*, штучно інфікованій ахолеплазмою.

## Висновки

Додавання у мікровеgetаційний дослід культур ризобій різних генотипів призводило до формування бобово-ризобійного симбіозу, що сприяло покращенню фізіологічного стану рослин. Штам ризобій, мутантний за синтезом ЛПС, на *M. sativa* частіше утворював нетипові бульбочки, що швидше старішали. У варіанті з подвійною інокуляцією люцерни ефективним штамом ризобій разом з ахолоплазмовою спосте-

рігалися зміни морфології бічних коренів рослин, а також деформація бульбочок. Результати проведеного дослідження свідчать не лише про здатність фітоплазм проникати через кореневу систему (оскільки саме корені були єдиним місцем контактування цих мікроорганізмів із рослинами) і мігрувати у надземні органи, а й можливість їх знаходження у бульбочках, утворених ризобіями.

## References

1. Borchsenius S.N., Chernova O.A., Chernov V.M., Vonsky M.S. Mycoplasma. St. Petersburg (Russia): Nauka, 2002. 319 p. [in Russian]
2. Korobkova K.S., Patyka V.P. Recent data on the causative agent of pale green dwarf (*Acholeplasma laidlawii* var. *granulum incertae sedis*) in Ukraine: pathogenicity and virulence factors and host reactions. *Agricultural Science and Practice*. 2015. Vol. 1. P. 30–31.
3. Ahmad J.N., Renaudin J., Eveillard S., Ahmad J.N., Renaudin J., Eveillard S. Molecular study of the effect of exogenous phytohormones application in “stolbur” phytoplasma infected tomatoes on disease development. *Phytopathog. Mollic.* 2015. Vol. 5. P. 121–122.
4. Vankova A.A., Ivanov P.I., Midyannik G.A., Serebrennikova L.A. Interaction between mycoplasmas (*A. laidlawii*) and plants (*Medicago sativa* and *Lyc. esculentum* Mill). *Izvestiya TSKHA*. 2008. Vol. 1. P. 129–133. [in Russian]
5. Skripal I.G., Malinovskaya L.P. Medium CM IMV-72 for isolation and cultivation of phytopathogenic mycoplasmas. *Microbiol. zhurn.* 1984. Vol. 46 (2). P. 71–75. [in Russian]
6. Zatovska T.V., Ushakov K.V., Yurgel S.N., Kosenko L.V., Zakharova I.Ya., Simarov B.V. Obtaining of Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti* with an changed lipopolysaccharides composition and analysis of their symbiotic properties. *Genetics*. 1998. Vol. 34 (6). P. 742–748. [in Russian]
7. Ivanova K.A., Tsyganova A.V., Brewin N.J., Tikhonovich I.A., Tsyganov V.E. Induction of host defences by *Rhizobium* during ineffective nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) carrying symbiotically defective mutations sym40 (PsEFD), sym33 (PsIPD3/PsCYCLOPS) and sym42. *Protoplasma*. 2015. Vol. 252. P. 1505–1517. [in Russian]
8. Tsyganova A.V., Kitaeva A.B., Brevin N.J., Tsyganov V.E. Cellular mechanisms of development of symbiotic nodules in leguminous plants. *Agricultural biology*. 2011. Vol. 3. P. 34–40. [in Russian]
9. Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 2010. Vol. 157. P. 361–379.
10. Chernov V.M., Mukhametshina N.Ye., Gogolev Yu.V., Nesterova T.N., Chernova O.A. Adaptation of mycoplasmas to unfavorable growth conditions: nanotransformation and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. *RASc Reports*. 2007. Vol. 413. P. 271–275. [in Russian]

## KOROBKOVA K.S., ZATOVSKA T.V., KHARCHUK M.S.

*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 154, e-mail: kkorobkova@ukr.net*

## MICROSCOPIC STUDIES OF THE PHYTOPLASMA INFECTION EFFECT ON THE SYMBIOTIC SYSTEM *MEDICAGO SATIVA* – *RHIZOBIUM MELILOTI* IN SIMULATED CONDITIONS

**Aim.** Aim of the study was to microscopically investigate the interaction of *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 with the target plant *Medicago sativa*, as well as to determine the role of *Rhizobium meliloti* strains with natural and defective polysaccharides in the plant's resistance occurrence. **Methods.** Cultivation of plants and their inoculation with bacteria was performed under conditions of microvegetation experiment. The study of the ultrastructure of alfalfa roots and nodules was carried out with both light and electron microscopy. **Results.** The rhizobial mutant strain, defective in the synthesis of lipopolysaccharides, more often formed atypical nodules on *M. sativa*, which aged faster. In the variant with double inoculation of alfalfa with rhizobia together with acholeplasma changes in the morphology of the lateral roots of plants, as well as deformation of the nodules were observed. **Conclusions.** Results of this study indicate not only the ability of phytoplasmas to penetrate the root system and migrate to plant aboveground organs, but also demonstrate the possibility of their presence in the nodules formed by rhizobia.

**Keywords:** Mollicutes, acholeplasma, rhizobia, mutant, lipopolysaccharides.