

УДК 631.523:576.31:632.38

МОРФОЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ
ПОСЕВНОЙ (*MEDICAGO SATIVA* L.) И ТОМАТА (*LYCOPERSICON*
ESCULENTUM MILL.), ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКОПЛАЗМАМИ
ACHOLEPLASMA LAIDLAWII

А.А. ВАНЬКОВА, к. б. н.; П.И. ИВАНОВ; Л.А. СЕРЕБРЕННИКОВА, к. б. н.

(Кафедра микробиологии)

Приведены результаты исследований лабораторной модели взаимодействия микоплазмы *Acholeplasma laidlawii*, широко распространенной в природе ультрамикроскопической бактерии, с растениями. На примере люцерны и томата впервые показано, что *A. laidlawii* вызывает различные реакции у растений. Установлено, что сорт томата Золотая капля индифферентен к микоплазмам в отличие от других сортов, проявляющих интенсификацию ростовых и метаболических процессов в присутствии микоплазмы. У растений, восприимчивых к инфекционному агенту, прослежены специфические морфологические изменения, характерные для микоплазмозов, возникающих в природных условиях. Анализ электронограмм ультратонких срезов мезофилла листа люцерны позволил выявить в клетках глубокие дегенеративные изменения. Практическая значимость работы определяется необходимостью идентификации факторов, обуславливающих невосприимчивость растений к микоплазмам, и поиска путей регулирования данной экологической системы с целью снижения экономических потерь от микоплазменных заболеваний.

Микоплазмы — прокариоты, лишённые клеточной стенки, широко распространены в природе. Мельчайшая величина этих микроорганизмов определяет ограниченность их биохимических возможностей и как следствие зависимость от других организмов. В процессе эволюции микоплазмы приспособились к сосуществованию с высшими эукариотами, они обнаружены в тканях млекопитающих, рептилий, рыб, членистоногих и растений [8]. Перечень организмов-хозяев микоплазм постоянно пополняется, при этом растёт и число описываемых видов микоплазм. Поскольку микоплазмы в тканях растений обычно находятся в тесной связи с мембраной клетки хозяина, их часто называют «мембранными паразитами». Присутствие ми-

коплазм в клетках многих растений даже короткий период может приводить к патологическим процессам инфицированного организма, эффективно нарушая деятельность его иммунной системы [6, 9]. В то же время у некоторых растений симптомы не проявляются годами, даже если эти микроорганизмы в большом количестве находятся в их тканях. Возможно, они «обходят» эффекторные воздействия иммунной системы хозяина [1].

Микоплазмы наносят существенный ущерб с.-х. производству, вызывая массовые заболевания растений, такие как филлодия клевера, круглолистность и «ведьмины метлы» картофеля, столбур пасленовых и т.д. [2, 5]. Потери от микоплазмозов растений ежегодно возрастают, что, вероятно,

связано с увеличением антропогенной нагрузки на экосистемы. Эффективные меры предотвращения и борьбы с микоплазменными заболеваниями растений до сих пор не разработаны, что во многом связано с недостаточной изученностью биологических особенностей взаимодействия макро- и микроорганизмов; с трудностями, стоящими перед исследователями, обусловленными тем, что это пограничная, многокомпонентная проблема, требующая комплексного подхода специалистов разных профилей.

Цель работы заключалась в изучении особенности влияния *Acholeplasma laidlawii* на морфологию и ультраструктуру клеток растений *Medicago sativa* и *Lycopersicon esculentum* Mill.

В опытах использованы микоплазма *Acholeplasma laidlawii*, штамм 1 (получен из НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН) и штамм 2 (предоставлен лабораторией молекулярных основ патогенеза КИББ КНЦ РАН); люцерна посевная *Medicago sativa* и томат *Lycopersicon esculentum* Mill, сортов Морковный, Золотая Капля и Манимейкер.

Влияние *A. laidlawii* на морфологические свойства, а также ультраструктуру клеток люцерны изучали в условиях краткосрочного (30 сут) стерильного модельного опыта. Семена люцерны стерилизовали по методу Натмана концентрированной серной кислотой в течение 4 мин, проращивали при комнатной температуре. Проростки помещали в стерильные сосуды с агаризованной питательной средой на основе растительного экстракта (СО) [10], и выращивали в условиях асептики при 12-часовом световом дне, температуре 20°C и освещенности 4 тыс. лк. Через 2 недели в среду добавляли 1 мл суспензии микоплазм *A. laidlawii*, штамм 1, с титром клеток $1,6 \cdot 10^6$. Культуру *A. laidlawii* наращивали в жидкой среде СО при температуре 20°C в течение 5 сут. Контроль — растения, выращенные на питатель-

ной среде без микоплазм. Повторность опыта 20-кратная. Присутствие микоплазм в инфицированных растениях подтверждено методами ДНК-гибридизации [3] и электронной микроскопии.

Препараты для трансмиссионной электронной микроскопии готовили следующим образом. Фрагменты листовых пластин шириной 0,5-1мм и длиной 1~2 мм фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2) с добавлением сахарозы (15мг/мл) в течение 4 ч при комнатной температуре. Постфиксацию материала проводили в 1%-м растворе OsO_4 на том же буфере в течение 2 ч. Дегидратацию и заливку материала в эпоксидную смолу проводили по стандартной методике. Ультратонкие срезы (600-900А), полученные на микротоме LKB-5 (Швеция), последовательно контрастировали 1%-м уранилацетатом (30 мин) и цитратом свинца по Рейнольдсу (10 мин) и просматривали в электронном микроскопе Hitachi-500 (Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и рабочем увеличении $\times 10000$.

Растения люцерны контрольного и опытного вариантов в первую неделю культивирования не имели различий. К 3-й неделе опыта у зараженных растений четко проявлялись внешние симптомы микоплазменной инфекции (табл. 1).

Так, средняя длина инфицированных растений превышала длину контрольных примерно в 2 раза. У зараженных микоплазмами растений по сравнению с контрольными наблюдались более утолщенные стебли, а также различия в окраске: у контрольных — красно-коричневые, у зараженных — зеленые стебли в течение всего опыта. Число листьев у инфицированных растений было в 1,5 раза больше, чем у контрольных (в среднем 8,5 шт. на растение), длина листовых пластин существенно не различалась, а ширина у зараженных растений незна-

Влияние *Acholeplasma laidlawii* на рост и развитие растений люцерны

Вариант	Длина растения, см	Число стеблей	Число междоузлий	Длина междоузлий, мм	Число листьев	Размер листа	
						длина, мм	ширина, мм
Контроль — растения без заражения	6,3±0,9	1,0±0,3	5,0±0,3	10,8±3,7	5,7±0,3	5,0±0,6	4,4±0,1
Растения, инфицированные <i>A. laidlawii</i>	11,1±2,7	1,4±0,2	7,9±0,6	18,3±5,9	8,5±0,5	6,1±0,6	5,7±0,5

чительно превышала таковую у контрольных (5,7 и 4,4 мм соответственно). У инфицированных растений отмечено большее число междоузлий (7,9 и 5,0 соответственно), кроме того, наблюдалась устойчивая тенденция к увеличению их длины.

Таким образом, 30-дневные растения люцерны, инфицированные *A. laidlawii*, отличались от контрольных большей высотой, мощностью, облиственностью и площадью листовой поверхности. Увеличение ширины листа, т. е. формирование более округлой листовой пластины, удлинение междоузлий и повышенная облиственность — характерные внешние признаки проявления микоплазменной инфекции [2].

При анализе ультраструктуры клеток листа, в частности фотосинтезирующих клеток мезофилла, у инфицированных растений выявлены серьезные дегенеративные изменения. Клетки контрольных растений имели типичное строение и характерную структуру основных клеточных компартментов (рис. 16, в). В клетках формирующейся флоэмы наблюдаются ядра, вакуоли, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и крупные хлоропласты со сравнительно хорошо развитой тилакоидо-гранальной системой и небольшим числом пластоглобул. В растениях, инфицированных микоплазмами, клетки сосудистых тканей выглядят «пустыми», что, скорее всего, связано с изменением степени гидратации цитоплазмы и некрозом части структур. Органеллы плохо различимы и видоизменены (рис. 1г, д).

Среди клеток сосудистых тканей встречаются клетки с отслоившимся протопластом, заполненные типичными по морфологии и ультраструктуре клетками ахолеплазм — сферической или овальной формы с диаметром 0,20—0,25 мкм невысокой электронной плотности и более мелкими, плотными структурами. Эти клетки не содержат пластид. Число митохондрий в растениях, инфицированных микоплазмами, заметно больше, чем в контрольных растениях, причем структура их в разных клетках изменяется от нормальной до чрезвычайно плотной с пузырьвидными кристами и признаками начинающейся деструкции. Встречается эндоплазматический ретикулум везикулярной формы. Клетки сосудистых тканей имеют видоизмененные плазмодесмы.

Таким образом, заражение микоплазмами растений люцерны в стерильной культуре приводит к существенным изменениям в ультраструктуре клеток мезофилла. Очевидно, при этом происходит нарушение пластидогенеза, что ведет к резкому сокращению числа хлоропластов. Клетки мезофилла постепенно утрачивают фотосинтетическую функцию. Локализация микоплазм в сосудистой ткани приводит к закупорке проводящих элементов и нарушению их нормальной функции. Выявленные на ультраструктурном уровне изменения, очевидно, приводят впоследствии к развитию таких характерных для микоплазмоза симптомов, как хлороз и увядание.

Влияние *A. laidlawii*, штамм 2, на морфологические особенности томата



Рис. 1. Ультраструктура клеток микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) в жидкой среде (а) и ультраструктурная организация клеток мезофилла листа люцерны (*Medicago sativa*): б, в — контрольные растения; г, д — растения, зараженные микоплазмой.

П — пластида; КС — клеточная стенка; В — вакуоль; МТ — митохондрия; Л — липид; ПД — плазмодесма, М — клетки микоплазм.

Масштабная линейка 0,5 мкм.

изучали в условиях нестерильного модельного опыта. 5-дневные проростки томата выдерживали в водной бактериальной суспензии с исходным титром 10^6 КОЕ/мл в течение суток, а затем помещали по одному растению в стаканы со 100 г тепличного грунта (pH_{H_2O} 7,1). Опыт проводили в фитотроне при 18-часовом световом дне, температуре 22-24°C и освещённости 5 тыс. лк в 4-кратной повторности. Присутствие микоплазм в тканях растений устанавливали ПЦР анализом на 10, 14, 18, 22 и 75-е сутки после инфицирования [4]. Контролем служили неинфицированные растения каждого сорта. Измеряли длину эпикотиля и площадь листовой поверхности растений с использованием фотопланиметра.

Результаты биометрических измерений растений в динамике показали, что длина эпикотиля и площадь листовой поверхности у инфицированных растений томата сортов Морковный и Манейкер больше, чем у контрольных. У

сорта Золотая Капля достоверных различий между инфицированными и контрольными растениями по этим показателям не выявлено (рис. 2, 3). Различная реакция сортов томата обусловлена продолжительностью периода пребывания микоплазм в тканях растений. С помощью ПЦР *A. laidlawii* была выявлена в растениях томата сорта Золотая Капля только в 1-й срок отбора проб — на 10-й день после инфицирования проростков. В последующие сроки анализа микоплазмы не были выявлены, в то время как в растениях других сортов положительный ответ регистрировали в течение всего опыта (75 сут).

Длительная персистенция *A. laidlawii* в вегетирующих растениях томата сортов Манейкер и Морковный стимулировала их развитие: активизировала метаболические процессы и способствовала интенсивному росту растений, что, очевидно, связано с адаптационными реакциями организ-

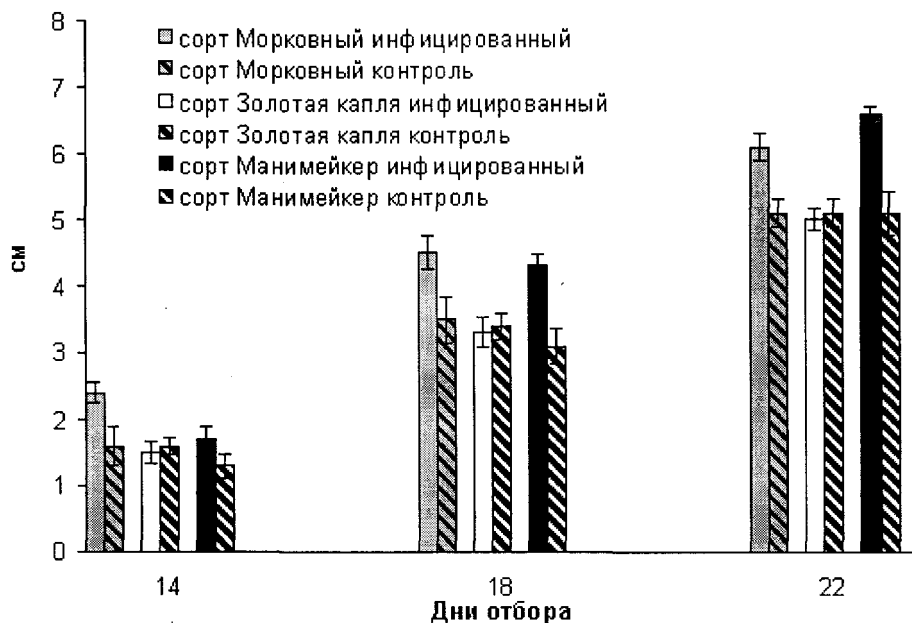


Рис. 2. Влияние *A. laidlawii* на длину эпикотиля растений томата

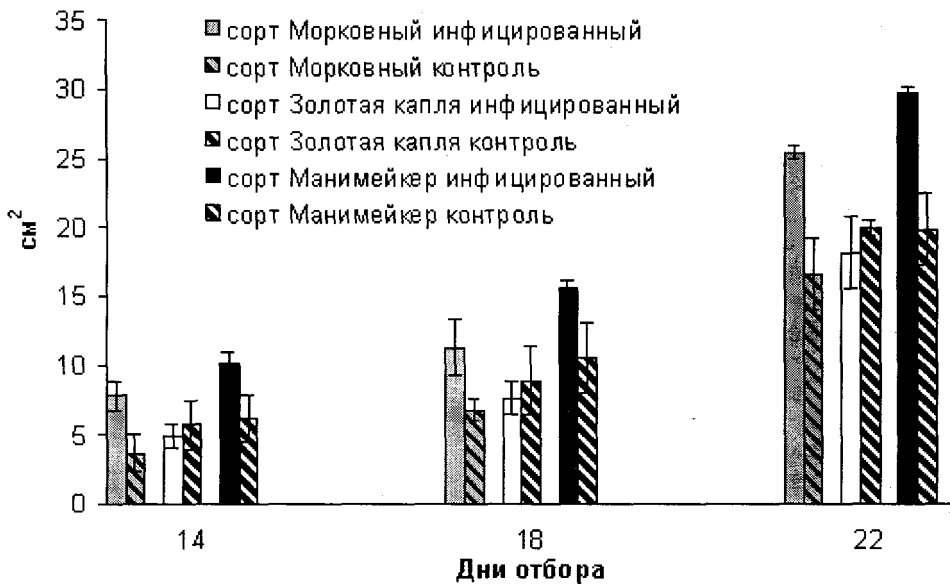


Рис. 3. Влияние *A. laidlawii* на площадь листовой поверхности растений томата

ма-хозяина на инфекционный агент. В течение всего опыта у инфицированных растений не обнаруживали характерных для микоплазмозов симптомов, таких как пожелтение, увядание, скручивание листьев, мелколистность, кроме более интенсивного роста растений.

Ключевую роль в процессах адаптации в рассматриваемой системе микоплазма — растение может играть реорганизация геномов взаимодействующих организмов [7]. Известно, что микоплазменные инфекции индуцируют перестройку в хромосомах растительных клеток. Установлено также, что в процессе взаимодействия происходит трансформация ахолоплазм в некультивируемые формы, сопровождающаяся перестройками в их геноме. Микоплазмы имеют очень высокий темп мутирования — до 10% в каждой генерации популяции оказываются мутантными. В этой связи персистенция в растительных клетках микоплазм может обуславливать постоянный «всплеск» защитных реакций растения (окислительный взрыв и синтез физи-

ологически высокоактивных соединений), которые и лежат в основе наблюдаемых морфофизиологических изменений.

Что касается сорта Золотая Капля, то в данном случае представляется возможным констатировать подавление микроорганизма иммунной системой растения. Отсутствие признаков инфекционного процесса у зараженных микоплазмами растений позволяет предположить, что существенное значение для реализации микоплазмоза имеет генотип растений. В этой связи особый интерес представляют генетически детерминированные факторы, определяющие невосприимчивость растений к микоплазменным инфекциям, которые еще предстоит идентифицировать.

Выводы

1. В модельных опытах с растениями *Medicago sativa* и *Lycopersicon esculentum* сортов Морковный и Манимейкер при заражении *A. laidlawii* прослежены изменения морфогенеза, характерные для микоплазмозов растений

в природных условиях, и процесс деградации ультраструктуры клеток листовой ткани. Выявлено, что инфицированные растения растут и развиваются более интенсивно, что свидетельствует о включении механизмов защиты растений и развитии адаптивных процессов в системе «микоплазма — растение».

2. Установлена сортовая устойчивость томата сорта Золотая Капля к *A.laidlawii*.

3. Разный характер поведения микоплазм в клетках растений, в которых они обитают, можно рассматривать как один из уровней экологии взаимодействия бактерий с окружающей средой — освоение ими своеобразной экологической ниши.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы, 2002. СПб. — 2. Власов Ю.И., Гените Л.П., Самсонова Л.Н. Ахолеплазмы-патогены растений. Вильнюс, 1985. — 3. Мидяник Г.А. Пути инфицирования микоплаз-

мами растений люцерны и их влияние на образование и эффективность бобово-ризобияльного симбиоза // Канд. дисс. М., 1995. — 4. Серебренникова Л.А. Почва как среда обитания фитопатогенных микоплазм // Канд. дисс. М., 2005. — 5. Скрипаль И.Г. Микоплазмы, 1988. Микроорганизмы-возбудители болезней растений / Под ред. В.И. Билай. Киев. С.326-372. — 6. Чернов В.М. Морфофизиологические и молекулярные аспекты взаимодействия микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) и растений // Автореф. канд. докт. дисс. Казань, 1998. — 7. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Попова Н.В., Чернова О.А. Генетическая изменчивость микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) при взаимодействии их с эукариотами (*Prunum sativum*) // ДАН, 1999. Т. 369. С.275-277. — 8. Razin S. // Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis / Eds J. Maniloff et al. Washington, 1992. P.3-22. — 9. Rottem S., Barile M. // Trends Biotechnol, 1993. Vol. 11. P. 143-151. — 10. Vankova A.A., Ivanov P.I. // Mat. of FEMS Workshop Rapid Diagnosis of Mycoplasmas». Jerusalem, 1991.

SUMMARY

The results of a laboratory model investigation of mycoplasma *Acholeplasma laidlawii*, ultramicroscopic bacterium widespread in nature are adduced. It's the first time *Acholeplasma laidlawii* has been found to cause various reactins in both alfalfa and tomato plants. It's been found that Golden drop tomato variety does not react to mycoplasmas in contrast to other varieties which show intensification of both growth and metabolic processes in the presence of mycoplasma. In plants receptive to infectious agent some specific morphological changes that characterize mycoplasmoses occuring under natural conditions, have been traced.