

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКОПЛАЗМ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*  
И РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ *MEDICAGO SATIVA*  
И ТОМАТА *LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL*

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

(Кафедра микробиологии)

В работе приводятся результаты экспериментальных исследований, подтверждающих возможность *Acholeplasma laidlawii*, одной из самых распространенных фитопатогенных микоплазм, внедряться в растение через неповрежденную корневую систему. Методами ДНК-ДНК гибридизации, электронной микроскопии и ПЦР установлена способность микоплазмы проникать в растения люцерны и томата через корневую систему из различных сред, в том числе из почвы, а также мигрировать в надземные части растений и длительно персистировать. Возможность проникновения *Acholeplasma laidlawii* из почвы позволяет иначе взглянуть на пути циркуляции микоплазмы в природе, экологию этой бактерии и утверждать, что почва играет роль транзитной среды между зараженными и здоровыми растениями.

### Введение

Микоплазмы — мельчайшие лишённые клеточной стенки бактерии относят к симбионтам (паразитам) позвоночных животных, насекомых и растений [9], понимая под симбиозом [5] биологическое явление тесной и длительной ассоциации различных организмов и расценивая паразитизм как один из множества вариантов симбиоза [8], при котором паразит физиологически зависит от своего хозяина, а его репродуктивный потенциал выше, чем у последнего. Одна из самых распространенных и известных микоплазм *Acholeplasma laidlawii* впервые была выделена из сточных вод и отнесена к сапротрофам. Однако в настоящее время известно, что многие штаммы *A. laidlawii* являются возбудителями заболеваний растений — микоплазмозов, широко распространенных в районах интенсивного возделывания с.-х. культур и наносящих существенный экономический ущерб.

Источником биозагрязнения агроценозов служат чаще всего стоки животноводческих комплексов, которые по существующей в России технологии используются для орошения с.-х. угодий без предварительного обеззараживания. Очевидно, что для обеспечения экологической безопасности продукции необходимо разработать эффективные методы контроля и меры по предотвращению данного вида загрязнения. Решение этих проблем невозможно без знания экологии и особенностей циркуляции возбудителя. Основную роль в распространении микоплазмозов растений традиционно отводят насекомым-переносчикам, как носителям и агентам инфицирования [1, 3]. В то же время в условиях *in vitro* экспериментально подтверждена возможность проникновения *A. laidlawii* в надземную часть люцерны и гороха через неповрежденную корневую систему [4, 7]. Этот факт позволяет иначе взглянуть на пути циркуляции *A. laidlawii* в природе, экологию этой бактерии,

предположить возможность проникновения микоплазм в растения непосредственно из почвы. Однако служит ли почва резервуаром возбудителя — средой его активной деятельности или же играет роль консерватора — промежуточной среды, где возбудитель лишь сохраняется в жизнеспособном состоянии, иными словами является ли почва источником данного микроорганизма или же фактором его передачи, носит гипотетический характер и требует дальнейших исследований.

Цель настоящего исследования заключалась в выяснении возможности внедрения *A. laidlawii* в растения через неповрежденную корневую систему из различных сред — водной суспензии, агаризованной питательной среды и почвы, а также способности микоплазмы к миграции и персистенции в тканях растений.

#### Объекты и методы

В опытах использовали: микоплазму *Acholeplasma laidlawii* штамм 1 (представлен НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи РАМН) и штамм 2 (предоставлен лабораторией молекулярных основ патогенеза КИББ КНЦ РАН); люцерну посевную *Medicago sativa* и томат *Lycopersicon esculentum* Mill, сортов Морковный, Золотая Капля и Манимейкер; почву — чернозём обыкновенный карбонатный (Воронежская обл., Таловский район).

Возможность проникновения *A. laidlawii*, штамм 1, в растения из питательной среды изучали в стерильном модельном опыте с люцерной. Семена люцерны стерилизовали 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 культивирования расте-

ний в питательную среду добавляли суспензию микоплазм *A. laidlawii* в количестве  $1,6 \times 10^6$  КОЕ/мл среды таким образом, чтобы растения контактировали с микоплазмами только через корневую систему. Контроль — растения, выращенные на питательной среде без микоплазм. Повторность опыта 3-кратная.

Обнаружение микоплазм в тканях 3-месячных растений проводили методом ДНК-ДНК гибридизации с использованием специфичных ДНК-зондов [2] и электронной микроскопии [6]. Дот-гибридизацию тотального препарата ДНК, выделенного из листьев люцерны, проводили со следующими ДНК-зондами: рА132, специфичным к *A. laidlawii*; рMgl6, специфичным ко всем представителям класса *Mollicutes*.

Проникновение *A. laidlawii*, штамм 2, в растения из водной бактериальной суспензии и из почвы изучали в модельных опытах с растениями томата. В первом случае проросшие семена помещали на сутки в суспензию микоплазм в воде с титром  $10^6$  КОЕ/мл, а затем высаживали в почву. Повторность 4-кратная. Во втором случае растения томата сорта Манимейкер выращивали в почве с предварительно интродуцированной популяцией микоплазм с титром  $10^9$  КОЕ/г почвы. Повторность 3-кратная.

Опыты с растениями томата проводили в фитотроне при 18-часовом световом дне, температуре 22–24°C и освещенности 5 тыс. лк. Культуру *A. laidlawii* наращивали в жидкой питательной среде *Mycoplasma Broth Base* (Becton Dickinson, USA) при температуре 28°C в течение 4 сут. Для увеличения титра клеток и удаления питательной среды культуру центрифугировали при 12000g 20 мин и t 4°C. Надосадочную жидкость сливали, осадок осторожно ресуспендировали в небольшом количестве воды.

Детекцию *A. laidlawii* в растениях проводили ПЦР-анализом в корнях, стеблях и листьях. После тщательно-

го предварительного отмывания растений из них выделяли ДНК. Для выявления *A.laidlawii* в качестве праймеров использовали олигонуклеотиды, синтезированные в ЗАО «Синтол», — M1-5'GAT GAA/ TG/T AGT AGC CGG TCG TAT CGG GA3', M2-5'CC/T AGG GTA GGC AAT CCT G/AT TAG ATG GGA CT3', фланкирующие ампликон размером 533 п.о. Программа реакции амплификации: 95°C — 1 мин, 55°C — 1 мин, 72°C — 2 мин 30 циклов; 72°C — 5 мин; хранение 10°C.

### Результаты и их обсуждение

Способность *A. laidlawii*, штамм 1, проникать из питательной среды СО в растение люцерны была установлена с помощью дот-гибридизации тотального препарата ДНК листьев люцерны. С помощью метода ДНК-ДНК гибридизации заражение растений микоплазмами может быть определено по гибридируемости ДНК, выделенной из анализированных растений, с ДНК микоплазм или с рекомбинантными плазмидами, содержащими ДНК микоплазм. В вариантах совместного культивирования люцерны и микоплазм последние тестировали в тканях растений в концентрации не ниже 0,1-

1,0 клеток микоплазм на одну клетку растения. В контрольном варианте микоплазмы не обнаружены.

При электронномикроскопическом исследовании срезов листовых пластинок в опытных вариантах в проводящих сосудах выявлены типичные по морфологии и ультраструктуре клетки микоплазм. В контрольном варианте такие структуры не обнаружены.

Результаты данного опыта свидетельствуют о способности микоплазм проникать в ткани растений через корневую систему, так как именно корни были единственным местом соприкосновения микоплазм и растений, мигрировать в надземные органы и длительно в них сохраняться.

При изучении способности внедрения *A. laidlawii*, штамм 2, из водной суспензии в растения томата результаты ПЦР-анализа показали присутствие *A. laidlawii* в 10-дневных проростках всех сортов (рис. 1). В последующие сроки отбора образцов положительный ответ зарегистрирован в растениях сортов Морковный и Манисейкер. В растениях же сорта Золотая Капля присутствие *A. laidlawii* не установлено (табл. 1). С одной стороны, это может быть связано с тем,

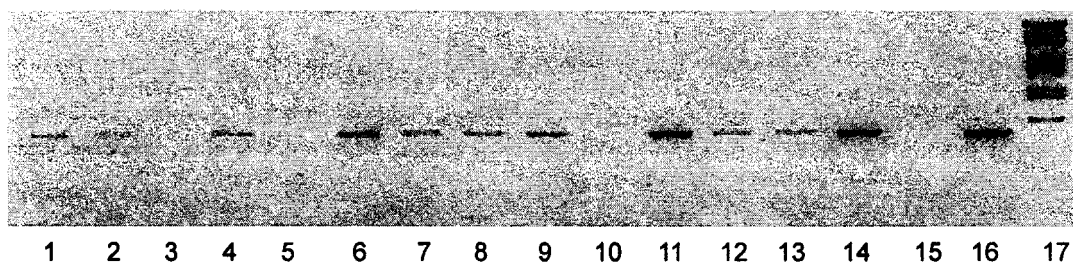


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов 3 сортов томата через 10 дней после инфицирования:

1-4 — растения томата сорта Золотая Капля, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности); 5 — неинфицированные растения томата сорта Золотая Капля (контроль); 6-9 — растения томата сорта Морковный, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности); 10 — неинфицированные растения томата сорта Морковный (контроль); 11-14 — растения томата сорта Манисейкер, инфицированные *A. laidlawii* (4 повторности); 15 — неинфицированные растения томата сорта Манисейкер (контроль); 16 — чистая культура *A. laidlawii* (положительный контроль); 17 — маркер размеров ДНК.

Таблица 1  
Идентификация *A. laidlawii* в различных сортах томата методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Сорт томата	Срок отбора, дни				
	10	14	18	22	75
Морковный	+	+	+	+	+
Золотая Капля	+	-	-	-	-
Манимейкер	+	+	+	+	+

 инфицированное растение  
 контроль

что ткани сорта Золотая Капля обладают устойчивостью к фитопатогену в результате действия механизмов иммунной защиты растения, которые включаются в ответ на проникновение микроорганизма. С другой стороны, можно полагать, что в отношении этого сорта растений формирование патогенных свойств у *A. laidlawii* находится еще на стадии сапротрофии, как

эволюционной стадии предшествеников фитопатогенных бактерий.

Таким образом, с помощью ПЦР-анализа образцов надземной части растений, выращенных из проростков, инфицированных путем замачивания в водной суспензии *A. laidlawii*, показано, что микоплазмы проникают в растения, в процессе онтогенеза перемещаются в надземные органы и длительно в них сохраняются.

Аналогично при изучении способности *A. laidlawii* проникать из почвы в растения томата сорта Манимейкер с помощью ПЦР-анализа было установлено присутствие микоплазм в растениях на 10, 14, 22, 30-е сут после интродукции. *A. laidlawii* может проникать из почвы в растение томата и мигрировать в надземные части растения. Проникновение микоплазм в этом случае происходит через корневую систему томата непосредственно из почвы, так как это единственное звено контакта микоплазм и растений. ДНК *A. laidlawii* обнаружена как в корнях, так и надземной части томата (рис. 2).

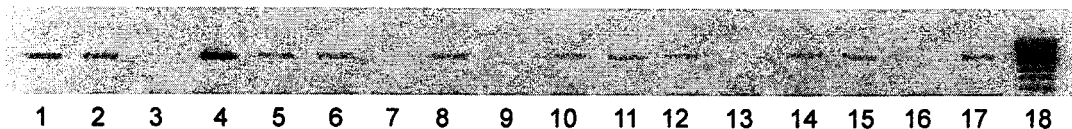


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов томата сорта Манимейкер:

1-3 — корни + надземная часть растений томата, 10 дней после инфицирования *A. laidlawii*; 4-6 — надземная часть растений, 14 дней после инфицирования *A. laidlawii*; 7 — корни, 14 дней после инфицирования *A. laidlawii*; 8-10 — надземная часть растений, 22 дня после инфицирования *A. laidlawii*; 11 — корни, 22 дня после инфицирования *A. laidlawii*; 12-14 — надземная часть растений, 30 дней после инфицирования *A. laidlawii*; 15 — корни, 30 дней после инфицирования *A. laidlawii*; 16 — неинфицированные растения томата, отрицательный контроль; 17 — положительный контроль — *A. laidlawii*; 18 — маркер размеров ДНК.

#### Выводы

1. Однородность результатов, полученных на растениях люцерны и томата, свидетельствуют о том, что корневая система растения как источник питания и сфера обитания благоприятна

для *A. laidlawii*, что *A. laidlawii* способна внедряться в неповрежденную корневую систему растения, создавая особую экологическую систему, основными составляющими которой становятся микроорганизм — фитопатогенная, а возможно, сапротрофная микоплазма, макроорга-

низм — растение и условия их взаимодействия.

2. Установлена способность *A. laidlawii* проникать через корневую систему люцерны и томата как из питательной среды и водной бактериальной суспензии, так и непосредственно из почвы. Этот факт позволяет утверждать, что почва может играть роль транзитной среды между зараженными и здоровыми растениями.

3. Методами ДНК-ДНК гибридизации, электронной микроскопии и ПЦР подтверждено, что микоплазмы способны также к миграции от корней в наземные части растений и длительной персистенции в растениях. Таким образом, можно полагать, что растение служит естественной экологической нишей для микоплазм.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богоутдинов Д.З. Фитоплазмы картофеля // Агро XXI. 2001. №7. — 2.

Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы. Л.:Наука, 1989. — 3. Власов Ю.И., Гените Л.П., Самсонова Л.Н. Ахлеплазмы-патогены растений. Вильнюс: Мин-во с.-х. Литовской ССР, 1985. — 4. Иванов П.И., Хайдарова Г.А., Баранова Е.Б. и др. Проникновение микоплазм в растения через корневую систему: Тез. докл. IV Всесоюз. конф. «Микроорганизмы в сельском хозяйстве». Пущино, 1992. С.69-70. — 5. Стейнер Э., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. М., 1979. Т.3. — 6. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. — 7. Чернов В.М. Морфофизиологические и молекулярные аспекты взаимодействия микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) и растений: Докт. дисс. биол. наук. М., 1998. — 8. Crofton H.D. Parasitology, 1971. V.62, 179-193. — 9. Methods in mycoplasmaology / J.G. Tully, S. Razin. New York, 1983, V.1. — 10. Vankova A.A., Ivanov P.I. // Materials of FEMS Workshop Rapid Diagnosis of Mycoplasmas, Israel, Jerusalem, 1991.

Рецензент — проф. В.А. Черников

#### SUMMARY

Results of experimental research confirming possibility of *Acholeplasma laidlawii*, one of the most wide-spread phytopathogenic mycoplasmas, to penetrate into a plant through intact root system are evaluated in the article. The ability of mycoplasma to penetrate into alfalfa and tomato plants through root system from various media, also from soil, to migrate into above-ground plant part portions and to persist for a long time has been established by DNA-DNA hybridization, electronic microscopy and PCR methods. The possibility of *Acholeplasma laidlawii* penetration from soil makes it possible to consider this mycoplasma ways of circulation differently in nature, ecology of this bacterium and to assert that soil serves as transit medium between infected and healthy plants.