

Ю.В. Коломієць¹, А.Ф. Ліханов², І.П. Григорюк¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, Київ, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Інститут еволюційної екології НАН України,
вул. Академіка Лебедева, 37, Київ, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

ПРОСТОРОВА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ І
СПЕЦИФІЧНІСТЬ ІНДУКОВАНИХ БАКТЕРІОЗІВ
У КАЛЮСНИХ ТКАНИНАХ *LYCOPERSICON*
ESCULENTUM MILL. *IN VITRO*

Мета. Дослідити специфічні реакції індукованого імунітету калюсних тканин томатів за умов інокуляції збудниками бактеріальних хвороб *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Методи. Гістохімічні дослідження калюсних структур томатів і специфіки патогенезу проводили на постійних препаратах. **Результати.** Показано, що у морфогенних калюсах створюються неоднорідні умови для проникнення бактерій у глибокі шари тканин. Підтверджено, що напрямки і швидкість поширення збудників у калюсах залежать від гетерогенності структур і типу сформованих тканин. З'ясовано, що провідні пучки, які в калюсах складені системою трахеїдоподібних елементів і знаходяться в осередку інфекції не сприяють її системному поширенню, а є центрами активної протидії патогенам. **Висновки.** Високий рівень стійкості проти *X. vesicatoria* виявили аксіальні структури ризогенного типу, що пов'язано з функціональними особливостями їх покривних тканин. Визначено, що бактерії не долають створених калюсами тканинних бар'єрів. У окремих груп клітин калюсів томатів *in vitro* виявлено ефект їх стійкості проти *P. syringae* pv. *tomato* за відсутності типових ознак індукованого імунітету, що розкриває нові аспекти в системі взаємодії патоген-хазяїн.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., збудники бактеріальних хвороб, калюс.

Фітопатогенні бактерії відзначаються багатовекторністю впливу на рослини, зокрема за участю гідролітичних ферментів, токсинів, фітогормонів, екзо- та ліпополісахаридів [1]. Інгібітори ферментів рослин і мембраноактивні речовини, які виявляються серед токсинів бактерій індукують некроз рослинних тканин, впливають на трансмембранне перенесення йонів й відкривають породици та зумовлюють в'янення рослин [2].

Бактерії роду *Clavibacter* зумовлюють в'янення рослин в результаті закупорювання судин. Вони продукують складні гетеро- або екзополісахариди (ЕПС), які оточують бактеріальні клітини, захищають їх від швидкого



зневоднення і зумовлюють концентрування в клітині поживних речовин й внутрішньоклітинних ферментів [7]. У бактерій роду *Xanthomonas* виявлено два різних біополімери, зокрема позаклітинний ЛПС, що вирізняється за своєю будовою і біологічними властивостями від ЛПС зовнішньої мембрани, та вуглеводовмісний біополімер, що представляє собою фітотоксичний полісахаридліпідний комплекс, який викликає утворення гелієвих структур у рослинних тканинах [4]. Патовари *Pseudomonas syringae* продукують широкий спектр фітотоксинів, зокрема коронатин, що за структурою нагадує жасмонову кислоту і спричиняє зниження рівня хлорофілу [9].

Метою даної роботи було дослідити специфіку впливу збудників бактеріальних хвороб на калюсні тканини томатів *in vitro*.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували калюсні тканини сортів томатів, які відрізнялися за стійкістю до збудників бактеріальних хвороб, зокрема Чайка (більш стійкий), Оберіг (середньо стійкий), Малиновий дзвін (не стійкий). В дослідженнях використовували фітопатогенні бактерії *X. vesicatoria* (Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 штам 9098 з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Штами *S. michiganensis subsp. michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984 штам P115 і *P. syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 штам

Pst-2, було отримано з Інституту пестицидів та захисту рослин, Сербія.

З метою прискореного одержання рихлого калюсу живильне середовище Мурашіге і Скуга доповнювали 8,0 мг/л 6-БАП й 4,0 мг/л ІОК. Інокуляцію калюсів культурою збудників проводили за допомогою стерильних шприців на 14 добу після пересаджування. Гістохімічні дослідження калюсних структур і специфіку бактеріозів проводили на постійних препаратах. Анатомічні зрізи, залитих у парафін зразків калюсів, робили на санному мікроскопі (7 – 8 мкм). Після депарафінізації тканини забарвлювали ацетофуксином. Якісне визначення поліцукридів, білків, суберину, лігніну в тканинах виконували за стандартними прописами [8]. Локалізацію бактерій *P. syringae* pv. *tomato* в калюсних тканинах визначали методом непрямого імуофлюоресцентного аналізу за використання прямих кролячих антитіл і вторинних поліклональних FITC мічених проти кролячих антитіл (Anti-RabbitIgG-FITC antibody, Sigma-Aldrich) відповідно протоколів [5]. Для уникнення неспецифічного зв'язування антитіл зріз попередньо обробляли 3% розчином БСА. ДНК у клітинах визначали флуоресцентним барвником DAPI. Рослинні тканини досліджували на люмінесцентному мікроскопі AxioScope A-1 CarlZeiss. Для отримання диференціального зображення флуоресценції тканин використовували люмінесцентні фільтри (для DAPI – EXG 365, BSFT 395, EMBP 445/50нм; для FITC – EXBP 475/40, BSFT500, EMBP 530/50 нм). Фотодокументацію і обробку отриманих даних виконували в спеціалізованій програмі для аналізу цифрових зображень – Image-ProPremier 9.0.

Результати та їх обговорення

Швидкість і специфіка розвитку бактеріозів в калюсних тканинах



томатів залежить від багатьох внутрішніх і зовнішніх чинників. Калюс томатів представлений складним комплексом компактно і рихло складених паренхімних клітин, меристемоїдних і аксіальних структур. Рихла паренхіма з вираженими міжклітинниками, як правило, зосереджена на периферії. Структурні особливості первинного неморфогенного калюсу зумовлені несинхронізованим поділом клітин і просторовою неорганізованістю транспорту поживних речовин. На рис. 1 представлені результати взаємодій калюсних тканин з бактеріями *X. vesicatoria* 9098.

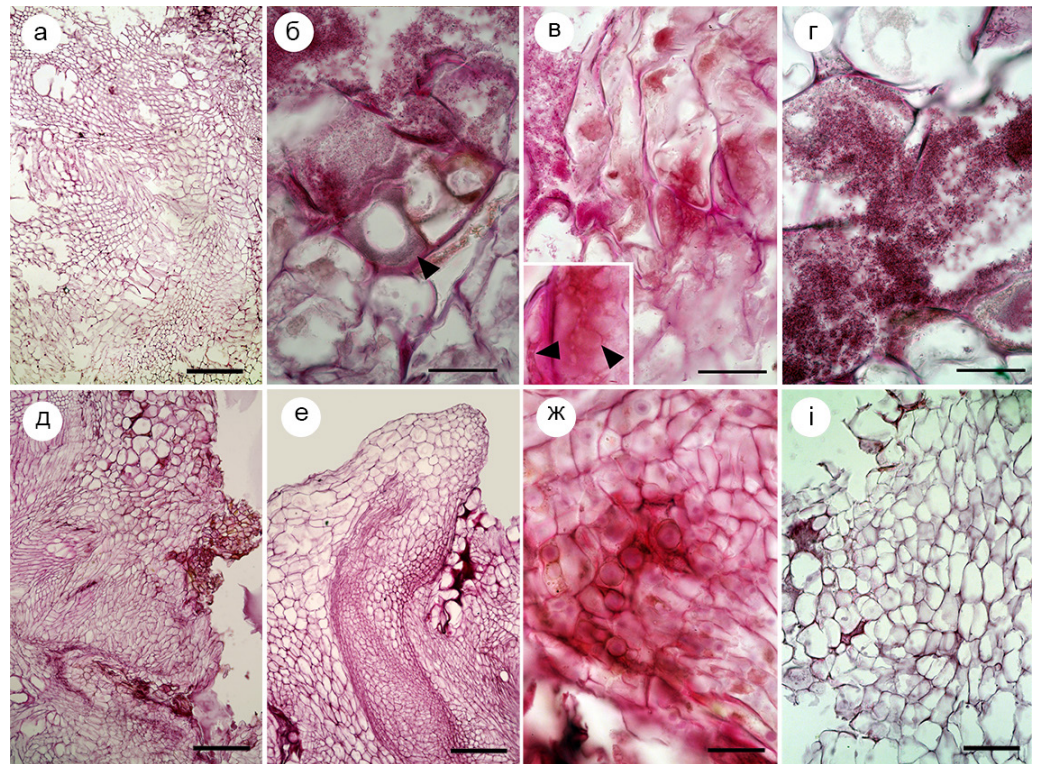


Рис. 1. Розвиток реакцій надчутливості у калюсах томату: а – контроль; б–г – під впливом *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2: б – індукована лігніфікація клітинних стінок і заповнення протопласта поліцукридами (вказано стрілками); в – утворення вакулярних структур; г – локалізація бактеріальної колонії в клітинах калюсу; д–ж – під впливом *X. vesicatoria* 9098: д – облітерація групи зовнішніх клітин і початок розвитку реакцій надчутливості у паренхіматозних клітин; е – стан аксіального органу в умовах бактеріальної інвазії; ж – специфічна трансформація калюсних клітин; і – розвиток бактеріозу під впливом *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P115; лінійка: а, д, е – 100 мкм; б, в, г – 25 мкм; ж, і – 50 мкм).

Fig. 1. Development of hypersensitivity reactions in tomato callus: а – control; б–г – under the influence of *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2: б – induced lignification of cell walls and protoplast filling with polysaccharides (indicated by arrows) в – formation of vacuolar structures; г – localization of bacterial colony in callus cells; д–ж – under the influence of *X. vesicatoria* 9098: д – obliteration of a group of external cells and the onset of development of hypersensitivity reactions in parenchymal cells; е – state of the axial organ in conditions of bacterial invasion; ж – specific transformation of callus cells; і – development of bacteriosis under the influence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P115; ruler: а, д, е – 100 μm ; б, в, г – 25 μm ; ж, і – 50 μm).



За високої вірулентності мікроорганізмів у калюсах розвивалася реакція надчутливості (РНЧ), внаслідок якої у деяких клітин потовщувалися клітинні стінки, відбувалася компартментація протопластів, руйнувався ядерний апарат (рис. 1, д, ж, і). З часом такі клітини втрачали життєздатність і створювали тканинні бар'єри, які перешкоджали поширенню інфекції в здорові тканини. За умов контакту *X. vesicatoria* штаму 9098 з рихлим калюсом, бактерії легко руйнували клітини і рухалися далі по міжклітинниках. Швидкий розвиток бактеріозу призупинявся біля морфогенних зон калюсних структур з відносно щільно складеними і просторово упорядкованими клітинами правильної геометрії.

Міжклітинники в таких зонах калюсів були менш розвинутими. Площа контакту між клітинами і відповідно швидкість переносу продуктів пластичного обміну, у тому числі сигнальних молекул, які запускають каскади біохімічних трансформацій і захисних реакцій, в таких структурах потенційно є значно вищою. Підтвердженням цьому є специфіка поширення бактерій *X. vesicatoria* 9098 в зоні формування аксіального органу, який за анатомічною будовою схожий на корінь-ризоїдну структуру (рис. 1, е). На рисунку показано, що ураження відбувалося лише в клітинах, які оточували аксіальний орган. Патогенні мікроорганізми зупинялися біля покривних тканин і орган залишався неушкодженим. Дана особливість, пов'язана з фізіологічною специфікою покривних тканин кореневої системи, зокрема наявності спеціальних молекулярних механізмів, які забезпечують їхню стійкість. Про те, що анатомічна форма стійкості рослин залежить від особливостей клітин і тканин та їх здатності мінімізувати дію стрес-чинників зазначалося в літературі [6]. Оскільки типова реакція індукованого імунітету не виражена, у даному випадку стійкість ризоїдної структури проти збудника чорної бактеріальної плямистості є конститутивною.

Трансформація калюсних тканин під дією вірулентного штаму *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2 в цілому була типовою для даного мікроорганізму. Клітинні стінки рослин у відповідь на токсичну дію просочувалися суберином і наповнювалися компонентами лігніну, що узгоджується із зазначеним в літературі фактом активації РНЧ-специфічних генів характерних для реакцій індукованого імунітету [3]. Лігнін інтенсивніше відкладався на тангентальних і фронтальних антиклінальних стінках, створюючи перешкоди на потенційних напрямках транслокації фітопатогенних бактерій. Втім, в розвитку патогенезу спостерігалися і певні відмінності. При ураженні тканин *P. syringae* pv. *tomato* у калюсах достатньо швидко розвивалися ознаки запрограмованої загибелі клітин: відбувалася конденсація і вакуоляризація цитоплазми, диспергування ядерної ДНК з вивільненням доволі крупних фрагментів нуклеїнових кислот. Важливою особливістю патогенезу даного типу є утворення у цитоплазмі рослинних клітин оптично густої однорідної маси поліцукридної природи. На мікрофотознімках (рис. 1, б–г) чітко визначено результат взаємодії калюсних клітин з бактеріями *P. syringae* pv. *tomato*. Важливою ознакою трансформації клітин під дією продуктів життєдіяльності *P. syringae* pv. *tomato* є формування у протопластах нових внутрішньоклітинних кластерів, що ізольовані між собою. За результатами наших досліджень процес їх

утворення відбувався в декілька етапів: спочатку уздовж плазмалеми, біля клітинних стінок, виявлявся оптично густий секрет. До його хімічного складу, як показали гістохімічні дослідження, входять поліцукриди. Останні заповнювали клітини і викликали розвиток специфічної захисної реакції. У протопластах *de novo* створювалися внутрішні клітинні стінки, які обмежували дифузний рух ендополіцукридів. Їх формування було подібним утворенню серединних пластинок при мітозі. На завершальних етапах новоутворені клітинні стінки мали не товстий, проте достатньо щільний лігнінофікований матрикс, який здатний уповільнювати транслокацію токсинів бактерій *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*. На нашу думку, за умов поділу протопласту, клітини забезпечують тимчасову функціональну автономність і відстрочують процеси загибелі. Саме для даних видів патогенних мікроорганізмів нами виявлено специфічну компартментизацію клітин в калюсах томатів.

Характер розвитку бактеріозів і поширення бактерій *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* по калюсним тканинам сортів томатів у наших експериментах був не агресивним та відносно повільним. Для бактерій даного виду характерним було виділення у зовнішнє середовище ЕПС. Відповідні захисні реакції з боку рослинних клітин мали менш виражений характер (рис. 1, і). Бактерії виявлялися переважно в міжклітинному просторі калюсних структур. Уражені клітини досить швидко відмежовувалися від здорових тканин і поширення інфекції блокувалися клітинними полімерами.

У калюсах з достатньо оформленою системою гідроцитів та інших гетерогенних структур, створювалися неоднорідні умови для проникнення бактерій у глибокі шари клітин. Розвиток бактеріозів, напрямок і швидкість поширення інфекції, виявляли тканини і групи клітин з різним рівнем стійкості. Застосування імунофлуоресцентного аналізу для виявлення локалізації бактерій *P. syringae* pv. *tomato* дозволили підтвердити це положення (рис. 2, а–б). Також було з'ясовано, що провідні пучки калюсних тканин, які складені системою гідроцитів або трахеїдоподібних елементів, в осередку інфекції не сприяли їхньому переносу, а були центрами активної протидії збуднику. В калюсах бактерії не долали створених тканинних бар'єрів, а між ураженими та живими клітинами утворювалася гістохімічно визначена межа (рис. 2, в).

На особливу увагу заслуговує той факт, що при поширенні інфекції не визначається чіткого переходу, який би свідчив про підвищення інтенсивності трансформацій вторинної клітинної стінки у здорових клітин, яку зазвичай викликають сигнальні системи рослин в умовах поширення інфекції. Наші спостереження свідчать про реактивний тип захисної системи калюсних тканин, який представляє найбільшу наукову цінність, оскільки розкриває потенційні можливості молекулярної взаємодії в системі – патоген-хазяїн.

Таким чином, під дією продуктів життєдіяльності *X. vesicatoria* і *P. syringae* pv. *tomato* відбувається трансформація клітин калюсу томатів, внаслідок якої в протопластах накопичуються густий секрет, до складу якого входять поліцукриди і утворюються клітинні перетинки. Розвиток бактеріозів, напрямок і швидкість поширення бактерій дозволили виявляти в калюсних тканинах томатів групи клітин з різним рівнем чутливості до інфекції. Високу стійкість проти *X. vesicatoria* виявили аксіальні структури



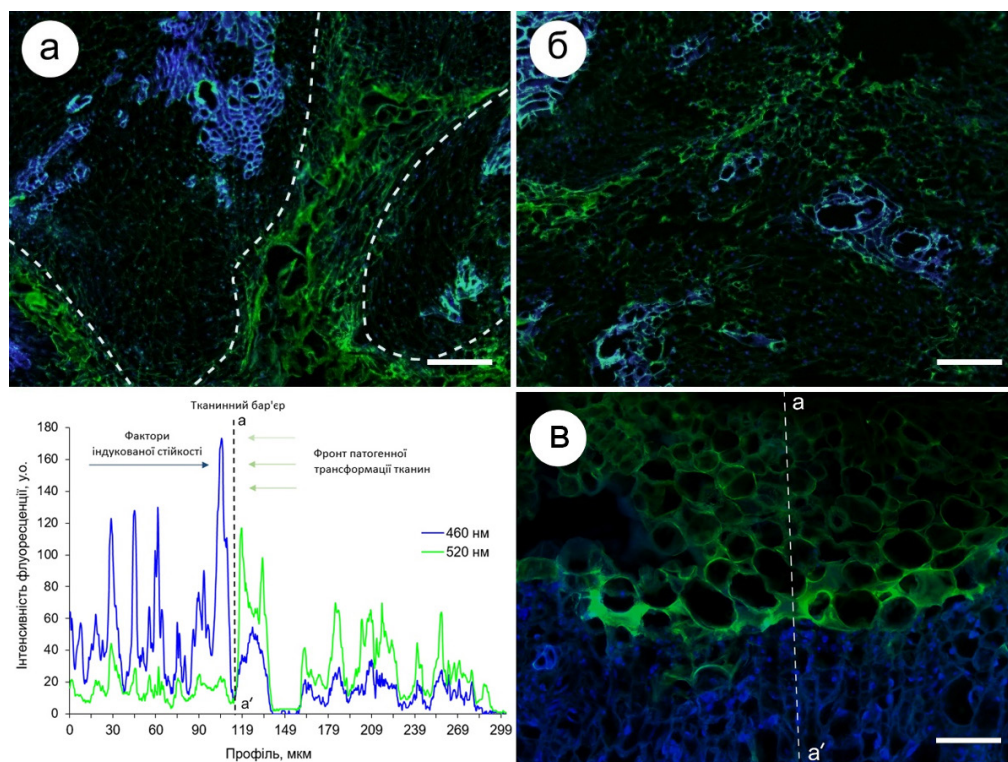


Рис. 2. Локалізація бактерій *P. syringae* pv. *tomato* в морфогенному калюсі томатів і розвиток захисних реакцій в зоні інфікування: а, б – зона транслокації бактерій (пунктиром виділена зона переважна для транслокації бактерій); синя флуоресценція – ДНК (DAPI) і лігніфіковані клітинні стінки; зелена флуоресценція – антитіла до білків *P. syringae* pv. *tomato* (FITC); в – профіль флуоресценції тканини на межі тканинного бар'єру, який створений у відповідь на ураження клітин; зелений фільтр – FITC; синій фільтр – DAPI (лінійка – а, б 100 км, в – 50 мкм).

Fig. 2. Localization of *P. syringae* pv. *tomato* in morphogenic tomato callus and the development of protective reactions in the infection zone: а, б – the zone of bacterial translocation (dotted line is the zone is preferred for translocation of bacteria); blue fluorescence – DNA (DAPI) and lignification of the cell walls; green fluorescence – antibodies to proteins of *P. syringae* pv. *tomato* (FITC); в – the tissue fluorescence profile on the face of the tissue barrier, created in response to cell damage; green filter – FITC; blue filter – DAPI (ruler – а, б 100 μm , в – 50 μm).

ризогенного типу, що пов'язано з функціональними особливостями покривних тканин. У калюсах томатів в умовах інокуляції патогенів *P. syringae* pv. *tomato* виявлено специфічний процес, що має реактивний характер. Він виражається у тому, що між ураженою і неуразеною частинами калюсу виділяється чітка межа, яка зумовлена відсутністю типових для рослинних клітин ознак реакцій індукованого імунітету.

Ю.В. Коломієць¹, А.Ф. Ліханов², І.П. Григорюк¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Обороны, 13 Киев, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Институт эволюционной экологии НАН Украины,
ул. Академика Лебедева, 37, Киев, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННОГО БАКТЕРИОЗА В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. *IN VITRO*

Реферат

Цель. Исследовать специфические реакции индуцированного иммунитета каллусных тканей томатов в условиях инокуляции возбудителями бактериальных болезней *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Методы.** Гистохимические исследования каллусных структур томатов и специфики патогенеза проводили на постоянных препаратах. **Результаты.** Показано, что в морфогенных каллусах создаются неоднородные условия для проникновения бактерий в глубокие слои ткани. Подтверждено, что направления и скорость распространения возбудителей в каллусах зависят от гетерогенности структур и типа сформированных тканей. Выяснено, что проводящие пучки, которые в каллусах составлены системой трахеидовидных элементов и находятся в очаге инфекции, не способствуют ее системному распространению, а являются центрами активного противодействия патогенам. **Выводы.** Высокий уровень устойчивости к *X. vesicatoria* проявляли аксиальные структуры ризогенного типа, что связано с функциональными особенностями их покровных тканей. Определено, что бактерии не преодолевают созданных каллусом тканевых барьеров. В отдельных группах клеток каллусов томатов *in vitro* обнаружен эффект их устойчивости против *P. syringae* pv. *tomato* при отсутствии типичных признаков индуцированного иммунитета, что раскрывает новые аспекты в системе взаимодействия патоген-хозяин.

Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., возбудители бактериальных болезней, каллус.

Yu. V. Kolomiets¹, A. F. Likhanov², I. P. Grigoryuk¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
13, Geroev Oborony str., Kyiv, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Institute of evolutionary ecology of NAS of Ukraine,
37, Academician Lebedev str., Kyiv, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

SPATIAL HETEROGENICITY AND SPECIFICITY OF INDUCED BACTERIOSIS IN CALLUS TISSUES *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. *IN VITRO*

Summary

Aim. To investigate specific reactions of induced immunity of callus tissues of tomatoes under conditions of inoculation with bacterial pathogens *X. vesicatoria*,



P. syringae pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Methods.** Histochemical studies of callus structures of tomatoes and specific pathogenesis were carried out on permanent preparations. **Results.** It was shown that inhomogeneous conditions are created in morphogenic calluses for penetration of bacteria into deep layers of tissue. It was confirmed that the direction and speed of propagation of pathogens in callus depends on the heterogeneity of the structures and the type of tissue formed. It was found that the conduction beams, which in callus are made up of a system of tracheoidal elements and are located in a source of infection, do not contribute to its systemic spread, but are the centers of active resistance to pathogens. **Conclusions.** A high level of resistance to *X. vesicatoria* was exhibited by axial structures of the rhizogenic type, which was associated with the functional characteristics of their integumentary tissues. It is determined that bacteria do not overcome the callus-created tissue barriers. In some groups of tomato callus cells, the effect of their resistance against *P. syringae* pv. *tomato* was detected in vitro in absence of typical signs of induced immunity, that reveals new aspects in the pathogen-host interaction system.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., agents of bacterial diseases, callus.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дьяков Ю.Т. Фундаментальная фитопатология. – М.: Красанд, 2012. – 512 с.
2. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. – Мн.: БГУ, 2006. – 116 с.
3. Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – 50, № 5. – С. 540–549.
4. Козулин В.В. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах : дисс. на соис. науч. степ. канд. биол. наук : специальность 03.00.07 «Микробиология». – Саратов, 2009. – 151 с.
5. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. – СПб: Соло, 2008. – 72 с.
6. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Клеточная стенка растений и механизмы устойчивости к патогенам // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015 – 19, № 6. – С. 715–723.
7. Bermpohl A., Dreier J., Bahro R., Eichenlaub R. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants // Microbiological Research. – 1996 – Vol. 151, № 4. – P. 391–399.
8. Pellicciari C., Biggiogera M. Histochemistry of single molecules. Methods and Protocols. – Humana Press, 2017. – P. 313–337.
9. Preston G.M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time // Molecular plant pathology. – 2000. – Vol. 1 (5). – P. 263–275.



References

1. Dyakov YuT Fundamental phytopathology. Moscow: Krassand, 2012. 512 p.
2. Zheldakova RA, Mamin VE Phytopathogenic microorganisms. Moscow: BSU, 2006. 116 p.
3. Karpun NN, Yanushevskaya EB, Mikhailova EV Mechanisms of formation of nonspecific induced immunity in plants under biogenic stress. Agricultural biology. 2015; 50 (5): 540–549.
4. Kozulin VV Carbohydrate-containing biopolymers *Xanthomonas campestris* and their role in phytopathogenic processes: diss. cand. biol. sciences: specialty 03.00.07 "Microbiology". Saratov, 2009. 151 p.
5. Sayfitdinova AF Two-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of biological samples. St. Petersburg: Solo, 2008. 72 p.
6. Smirnova OG, Kochetov AV Cell wall of plants and mechanisms of resistance to pathogens. Vavilovsky Journal of Genetics and Selection. 2015; 19 (6): 715–723.
7. Bermpohl A, Dreier J, Bahro R, Eichenlaub R. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiological Research. 1996; 151 (4): 391–399.
8. Pellicciari C, Biggiogera M. Histochemistry of single molecules. Methods and Protocols. Humana Press, 2017: 313–337.
9. Preston GM. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular plant pathology. 2000; 1 (5): 263–275.

Стаття надійшла до редакції 16.08.2017 р.

