УДК 579.887:576.5(045)

К.С. Коробкова[1], Л.П. Панченко[1], А.М. Онищенко[1], А.М. Остапчук[1],О.О. Панюта[2]

[1]Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154., Київ, МСП 680, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 09, e-mail: kkorobkova@ukr.net

[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 60, Київ, 01033, Україна, e-mail: panyuta@ukr.net

ВПЛИВ МІКОПЛАЗМОВОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ ТА МОРФОЛОГІЮ КЛІТИН КАЛЮСІВ ПШЕНИЦІ

Створено експериментальну модель мікоплазмовоїї інфекції рослин з використанням фітопатогенного молікута Acholeplasma laidlawii var. granulum шт. 118 і калюсних тканин пшениці. У інфікованому ахолеплазмами матеріалі відбувалися як зміни морфології рослинних клітин, так і зміни у складі жирних кислот їх загальних ліпідів, що свідчить про активну життєдіяльність фітопатогенних ахолеплазм у калюсних тканинах рослини і включення захисних механізмів рослини у відповідь на стрес.

К л ю ч о в і с л о в а : молікути, фітопатогенез, калюс, стрес.

Мікоплазмози рослин широко розповсюджені в регіонах інтенсивного землеробства, а за шкідливістю хвороби рослин мікоплазмової етіології відносять до катастрофічних хвороб, які можуть набувати характер епіфітотій. Пригнічення і контроль мікоплазмових інфекцій рослин є проблемою, вирішення якої пов'язано з вивченням молекулярних механізмів взаємодії мікоплазм (молікутів) з рослинними клітинами, закономірностями персистенції цих мікроорганізмів і обумовлений ними фітопатогенез. Всебічне вивчення двох складових інфекційного процесу — патогена і клітин організму-живителя у динаміці їх взаємодії у випадку мікоплазмозу рослин можливе із застосуванням методу сумісного культивування фітопатогенних мікоплазм і рослинних клітин (або інфікування в умовах in vitro), яке є найбільш спрощеною модельною системою для дослідження стосунків хазяїна і паразита [2, 5].

З огляду на те, що одним з проявів взаємодії рослини і фітопатогенного організму є реакція рослинних клітин на стрес у вигляді включення сигнальних механізмів, зокрема, ліпооксигеназної системи [1, 8], метою роботи було дослідити зміни у складі жирних кислот ліпідів калюсів пшениці, що відбуваються під впливом інфікування фітопатогенним представником класу Mollicutes. Крім того, цікавим було дослідити фітопатогенез мікоплазмозу пшениці на клітинному рівні, для чого використовували спрощену модель впливу патогенної ахолеплазми на морфологію калюсних клітин.

© К.С. Коробкова, Л.П. Панченко, А.М. Онищенко, А.М. Остапчук, О.О. Панюта, 2010

Матеріали і методи

Калюсні культури отримували з експлантів вирощених in vitro рослин озимої пшениці сортів Роазон і Магістр, як описано раніше [2] і культивували на середовищі МС (з додаванням 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти). Молікут *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118, що спричиняє блідо-зелену карликовість пшениці (отриманий з Національної колекції мікроорганізмів України і зберігається у відділі мікоплазмології Інституту мікробіології і вірусології НАН України), культивували на штучному середовищі СМ IMB-72 [7]. Інокуляцію калюсів проводили стерильними шприцами на 7, 14, 21, 28 добу пасажу, шляхом пошкодження і внесення культури ахолеплазм стерильним шприцом [3].

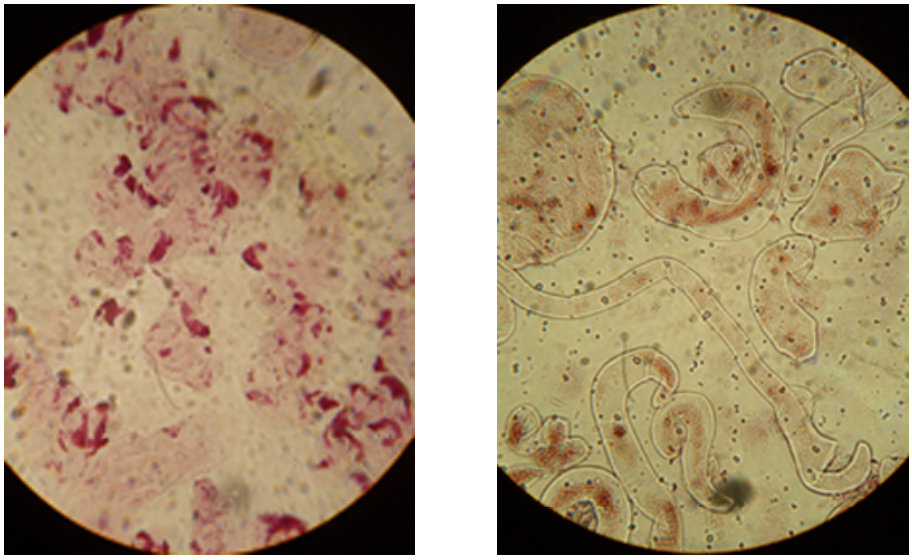
Для визначення клітинних жирних кислот використовували 500–600 мг сирого рослинного матеріалу. Метилові ефіри жирних кислот одержували шляхом гідролізу досліджуваних зразків калюсів у 1%-ому розчині H_2SO_4 в метанолі протягом 1 год при 80 °С. Ефіри екстрагували двічі сумішшю ефір-гексан (1:1) [6]. Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували за допомоги газового хроматографу Hewlett-Packard 6890 та мас-спектрометру Hewlett-Packard 5973. Метилові ефіри ідентифікували за тривалістю утримання їх порівняно з стандартами (Supelco). Вміст жирних кислот у відсотках від загальної площі піків визначали за допомоги програмного забезпечення Chem Station. Для вивчення змін морфології клітин калюсу пшениці під впливом *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 застосовували метод давлених препаратів [4], світлову мікроскопію проводили за допомоги мікроскопу Ломо (Санкт-Петербург, Росія). Дослідження виконували у трьох повторностях.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що найбільш активно калюсні культури пшениці уражуються фітопатогенними ахолеплазмами на 14 добу після перенесення на свіже культуральне середовище. Калюсні культури іншого віку виявились менш чутливими до інфекції. Згідно спостережень, калюси, інфіковані молікутами, росли більш інтенсивно, до того ж клітини їх були значно більшими порівняно із контрольними (рис.), що узгоджується з даними Петру з співавт. [11, 12], який досліджував калюси, отримані з інфікованих рослин.

При дослідженні калюсів пшениці, інфікованих *A. laidlawii var. granulum* шт. 118, методом світлової мікроскопії було виявлено ряд специфічних особливостей рослинного матеріалу, зокрема, наявність великих міжклітинників, надмірна вакуолізація тощо. Встановлено, що під впливом інфекції фітопатогенними ахолеплазмами клітини калюсів змінюють свою форму з округлої до надмірно витягнутої, підвищується інтенсивність утворення поліплоїдних форм, розташованих групами у полі зору з більшою частотою порівняно з неінфікованими варіантами. Така реакція уражених калюсних клітин в культурі *in vitro* є проявом мутагенного впливу молікутів на генетичний апарат клітин рослини, що в природі призводить до утворення типових симптомів мікоплазмозів на рослинах у вигляді потворних форм — «відьминих мітел», карликовості тощо [1, 10].

Відомо, що інфікування рослин фітопатогенами призводить до підвищення вмісту в їх клітинах активних метаболітів кисню, інтенсифікацією деградації біополімерів і ліпідів тощо [8, 9]. Слід відзначити, що у наших дослідженнях у інфікованому ахолеплазмами матеріалі спостерігалися як зміни морфології рослинних клітин, так і зміни у складі жирних кислот їх загальних ліпідів, що свідчить



А Б

Рис. Клітини калюсів пшениці: А — контроль, неінфіковані; Б — уражені фітопатогенним молікутом *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118 (х400)

Fig. Callus cells of wheat: A — uninfected control; Б — infected by plant pathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii var. granulum* str. 118 (x400)

про активну життєдіяльність фітопатогенних ахолеплазм у калюсних тканинах рослини і включення захисних механізмів рослини (ліпооксигеназний сигнальний шлях). При вивченні складу жирних кислот загальних ліпідів калюсів пшениці як стерильних, так і інфікованих, встановлено наявність $C_{14:0}$ (тетрадеканової), $C_{16:0}$ (гексадеканової), $C_{18:0}$ (октадеканової), та $C_{18:1}$ (октадеценової) кислот. Між калюсами різних сортів пшениці розбіжностей за складом жирних кислот загальних ліпідів не виявлено, проте під впливом мікоплазмової інфекції спостерігалися деякі зміни у їх співвідношенні (табл).

Для калюсів пшениці сортів Магістр і Роазон встановлено значний вміст насичених жирних кислот (до 83,63%). Звертає на себе увагу той факт, що у обох досліджуваних сортів пшениці переважає гексадеканова кислота, частка якої складає 51,89–63,07% від загальної кількості жирних кислот.

У інфікованих культурою *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 калюсах пшениці сорту Магістр, на відміну від стерильних, спостерігали зменшення кількості октадеценової і збільшення вмісту октадеканової кислот. Ці зміни у сорту Магістр зумовили збільшення співвідношення насичених до ненасичених жирних кислот у 1,4 раза. Вміст жирних кислот калюсів пшениці сорту Роазон під впливом мікоплазмової інфекції також дещо змінювався: відзначено збільшення майже на 10% октадеценової та зменшення вмісту (також на 10%) гексадеканової кислот. Внаслідок цих змін відбулося зниження співвідношення насичені/ненасичені жирних кислот порівняно з контролем. Слід відзначити, що сорт Роазон було створено як стійкий відносно збудника церкоспорельозу пшениці *Pseudocercosporella herpotrichoides*. Вважають, що збільшення кількості ненасичених жирних кислот пов'язано з формуванням відповіді рослини на вторгнення патогена, оскільки відомо, що в основі механізму

адаптації рослин до стресу є здатність до регуляції ступеня ненасиченості ліпідів мембран рослинних клітин.

Таблиця

Жирнокислотний склад загальних ліпідів калюсів пшениці, інфікованих *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118

Table

Fatty acid composition of common lipids of wheat calluses infected by *Acholeplasma laidlawii var. granulum* str.118

Варіант досліду	Вміст жирних кислот, % від загальної кількості				Жирні кислоти		Відношення насичені/ ненасичені жирні кислоти
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	насичені	ненасичені	
МАГІСТР							
Контроль	4,85±0,3	51,89±0,1	20,9±0,4	22,36±0,2	77,64±0,3	22,36±0,2	3,5
Дослід	4,82±0,3	53,75±0,2	25,11±0,2	16,32±0,3	83,68±0,2	16,32±0,3	5,1
РОАЗОН							
Контроль	4,77±0,3	63,07±0,4	11,34±0,3	20,82±0,1	79,18±0,3	20,82±0,1	3,8
Дослід	4,35±0,2	52,97±0,2	12,44±0,3	30,24±0,4	69,76±0,2	30,24±0,4	2,3

Примітка: Жирні кислоти – $C_{14:0}$ – тетрадеканова, $C_{16:0}$ – гексадеканова, $C_{18:0}$ – октадеканова, $C_{18:1}$ – октадеценова

Note: Fatty acids – $C_{14:0}$ – tetradecanoic, $C_{16:0}$ – hexadecanoic, $C_{18:0}$ – octadecanoic, $C_{18:1}$ – octadecenoic

При цьому збільшується кількість ненасичених жирних кислот, вміст яких, за даними літератури, у більш стійких рослин є дещо вищим, ніж у сприйнятливих [9]. Те, що зараження молікутами призводить до різниці у реакції між сортами, відмінними за чутливістю до хвороби грибної етіології, вірогідно, свідчить про аналогічну різницю у їх сприйнятливості до мікоплазм.

З огляду на те, що мікоплазмові інфекції індукують включення сигнальних систем рослин, які визначають неспецифічну фітореактивність, спрямовану на пригнічення патогенних мікроорганізмів [1, 9], можливо зробити висновок, що зміни у вмісті жирних кислот інфікованих фітопатогенними молікутами калюсів, як і перетворення у морфології клітин, є проявами відповіді клітин рослини на біотичний стрес.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С.* Микоплазмы. — С.-П.: Наука, 2002. — 319 с.

2. *Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В.* Технология микроклонального размножения растений — К.: Наук.думка, 1992. — 232 с.

3. *Коробкова К.С., Онищенко А.М., Панченко Л.П., Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Редько В.І.* Створення модельної системи *in vitro* для вивчення взаємодії фітопатогенних молікутів з клітинами рослин // Мікробіол. журн. — 2009. — 71, № 4. — С. 58–62.

4. *Кунах В.А., Левенко Б.А.* Модификация метода давлених препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. — 1975. — IX, № 1. — С. 56–58.

5. *Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В.* Культура клеток и тканей в изучении взаимоотношения патогена и растения-хозяина // Биологические науки. — 1990. — № 2. — С. 6–21.

6. *Синяк К., Хеден Г., Рихаге Р., Фри Г., Мэрде М.* Газовая хроматография липидов клеток животных и возможности этого метода для идентификации лабораторных линий животных // Вопр. вирусол. — 1972. — № 2. — С. 228–235.

7. *Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П.* Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. — 1984. — 46. — № 2. — С. 71–75.

8. *Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Свєтлова Н.Б., Мусієнко М.М.* Жирні кислоти гліколіпідів хлоропластів у передачі стрес-сигналу та формуванні загальної адаптивної відповіді на посуху // Доповіді Національної академії наук України. — 2002. — № 6. — С. 171–175.

9. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 296 с.

10. *Чернов В.М., Чернова О.А.* Микоплазменные инфекции как возможный фактор генетических изменений в клетках высших эукариот // Цитология. — 1996. — 38, № 2. — С. 107–114.

11. *Petru E., Limberk J. Ulrychova M., Break J.* Growth and infectivity of callus cultures of tomato plants infected with a mycoplasme disease-potato witches broom // Biol. plant., 1971. — 13, N 5/6. — P. 391–395.

12. *Petru E., Ulrychova M.* Persistence and spread of mycoplasma in axenic callus tissue cultures of tobacco (Nicotiana glauca Qrah.) in the presence of kinetin and IAA in nutrient medium // Biol. plant. — 1975. — 17, N 5. — P. 352–356.

Е.С. Коробкова[1], Л.П. Панченко[1], А.Н. Онищенко[1], А.Н. Остапчук[1],О.А. Панюта[2]

[1]Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП 680, Украина
тел.: +38 (044) 526 23 09, e-mail: kkorobkova@ukr.net
[2]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, Киев, 01033, Украина, e-mail: panyuta@ukr.net

ВЛИЯНИЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩИХ ЛИПИДОВ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ

Реферат

Создана экспериментальная модель микоплазменной (молликутной) инфекции растений с использованием фитопатогенного молликута *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118 и каллусных тканей пшеницы. В инфицированных ахолеплазмами каллусах происходили изменения как морфологии клеток, так и в жирнокислотном составе их общих липидов, что свидетельствует об активной жизнедеятельности фитопатогенных ахолеплазм и о включении защитных механизмов каллусных клеток пшеницы в ответ на стресс.

Ключевые слова: молликуты, фитопатогенез, каллусы, стресс.

K.S. Korobkova[1], L.P. Panchenko[1], A.M. Onischenko[1], A.M. Ostapchuk[1], O.O. Panuta[2]

[1]D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology NASU, 154, Zabolotny str., Kyiv, MSP 680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 09, e-mail: kkorobkova@ukr.net
[2]Kyiv National Taras Shevchenko University, 60, Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine, e-mail: panyuta@ukr.net

MYCOPLASMA INFECTION EFFECT TO FATTY ACID COMPOSITION OF COMMON LIPIDS AND TO WHEAT CALLUS CELLS MORPHOLOGY

Summary

It was created the experimental model of mycoplasma (mollicute) infection of plants by using of the plant pathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii var. granulum* str. 118 and callus tissue of wheat. In the acholeplasma infected calluses the cell morphology and lipid composition were changed that evidences to life activity of plant pathogenic acholeplasmas and to the activation of protect mechanisms in wheat callus cells as the answer to stress.

K e y w o r d s : mollicutes, plant pathogenesis, calluses, stress.