

КОРОБКОВА Е.С.✉, ЗАТОВСКАЯ Т.В., ПАТЫКА В.Ф.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: kkorobkova@ukr.net

✉ kkorobkova@ukr.net, (044) 526-23-09

ВЛИЯНИЕ Tn5-МУТАНТА *RHIZOBIUM MELILOTI* С ИЗМЕНЕННЫМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ МИКОПЛАЗМОЗА ЛЮЦЕРНЫ

Микоплазмы являются широко распространенными болезнями молликутной этиологии, приводящими к массовым поражениям культурных растений, и способными практически полностью уничтожить урожай сельскохозяйственных культур. Ввиду особенностей биологии возбудителей – молликутов (микоплазм), в частности таких, как мембранный паразитизм и генотоксичность, эффективных специфических средств борьбы с ними не существует [1]. Исходя из этого, перспективным является поиск экологически обоснованных альтернативных путей снижения вредоносности этих заболеваний, среди которых особое значение имеет повышение защитных функций растения-хозяина за счет улучшения его физиологического состояния и усвоения питательных веществ.

Почвенные бактерии сем. *Rhizobiaceae* (клубеньковые бактерии) вступают в симбиоз с бобовыми растениями, при этом на корнях растений формируются клубеньки, где бактерии фиксируют атмосферный азот. Формирование симбиоза – сложный, специфичный процесс, протекающий при участии различных сигнальных молекул обоих партнеров [2]. Важную роль в становлении бобово-ризобияльного симбиоза играют поверхностные полисахариды ризобий, среди которых липополисахариды (ЛПС), составляющие внешний слой клеточной стенки бактерий. Липополисахариды – наименее исследованные полисахариды у *Rhizobium* (у ряда авторов – *Sinorhizobium meliloti*). Эти соединения защищают бактерии от неблагоприятных условий внешней среды и участвуют в прикреплении их к корневым волоскам растения наряду с адгезинами и пилиями. Однако главная функция полисахаридов в формировании симбиоза – сигнальная [3]. Основным подходом в изучении функций, структуры и генетики синтеза полисахаридов остается получение Tn5-транспозоновых мутантов с нарушениями синтеза поли-

сахаридов.

Известно, что низкомолекулярные формы экзополисахаридов (ЭПС) ризобий необходимы на стадии инфицирования растения-хозяина. Они подавляют защитную реакцию растения-хозяина, развивающуюся в ответ на вторжение бактерий. ЛПС играют важную роль на более поздних стадиях формирования симбиоза. При этом синтез ЛПС и ЭПС у клубеньковых бактерий находится под влиянием глобальных транскрипционных регуляторов, играющих важную роль в адаптации бактерий к условиям окружающей среды в свободноживущем состоянии и в симбиозе с растениями [4].

Исходя из вышеуказанного, целью исследования было установить влияние ризобий, в том числе с измененными полисахаридными характеристиками, вступающих в симбиоз с бобовыми растениями, на проявление экспериментального микоплазмоза в лабораторных условиях.

Материалы и методы

В исследованиях использовали штаммы ризобий: *R. meliloti* 425a – типичный эффективный штамм, на основе которого создан препарат Ризоторфин (ВИЗР, Россия), производный от него штамм СХМ1-188 *R. meliloti*, обладающий повышенной эффективностью, а также штамм Tb29, полученный из этой культуры путем Tn5-транспозонового мутагенеза [5]. Бактерии *R. meliloti* выращивали на среде TY.

Выполняли Tn5-транспозоновый мутагенез с помощью плазмиды pSUP5011 (характеристика- pBR325-Tn5::mob) [5]. Полученные Tn5-транспозанты тестировали на селективных средах для выявления среди них мутантов с нарушениями синтеза ЛПС и других поверхностных полисахаридов.

Для отбора мутантов с изменениями синтеза поверхностных полисахаридов использовали: 1) минимальную среду с 0,02 % Конго крас-

ным; 2) среду LB с 0,1 % дезоксихолатом натрия (LB+ДОХ); 3) среду LB с 0,02 % Калькофлуором белым.

В исследованиях использовали культуру фитопатогенного молликута *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 (плотность культуры составляла $5 \cdot 10^5$ кл/мл среды), полученную из Национальной коллекции микроорганизмов Украины и сохраняющуюся в Институте микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины. Ахолеплазму культивировали на питательной среде СМ ИМВ-72 в течение 72 ч при 32°C [6].

Изучение воздействия микроорганизмов на растения проводили в лабораторных условиях (микровегетационный метод), при этом использовали семена *Medicago sativa* сорта Синюха. Семена люцерны подвергали поверхностной стерилизации концентрированной серной кислотой в течение 7 мин, промывали стерильной водой и проращивали в течение суток на чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. Для выращивания растений использовали среду Красильникова-Кореняко [7]. В каждую пробирку высаживали по два проростка, через сутки проростки инокулировали исследуемым штаммом бактерий. Для инокуляции использовали 1 мл суспензии бактерий в растворе микроэлементов (10^7 – 10^8 клеток на мл: H_3BO_3 – 5,0 г/л, $(NH_4)_2MoO_4$ – 5,0 г/л, KCl – 0,5 г/л, NaBr – 0,5 г/л, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 г/л, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$ – 0,3 г/л, $MnSO_4$ – 0,2 г/л).

Заражение растений фитопатогенной ахолеплазмой проводили методом инъекции в околокорневую область через 2 дня после внесения ризобий. Растения выращивали при температуре 17–19°C и естественном освещении в условиях лаборатории в течение 40 дней. Эффективность симбиоза оценивали по массе высушенных побегов растений, инокулированных исследуемыми штаммами микроорганизмов, а также по их биометрическим показателям.

Результаты и обсуждение

Выполняли Tn5-транспозонный мутагенез с помощью плазмиды pSUP5011 [5]. Полученные Tn5-транспозанты тестировали на селективных средах для выявления среди них мутантов с нарушениями синтеза ЛПС и других поверхностных полисахаридов.

В ходе тестирования показано, что полученный нами мутант Tb29 отличался от родительского штамма СХМ1-188 *R. meliloti* на минимальной среде с Конго красным (табл. 1). Родительский штамм образовывал на этой среде розовые слизистые колонии, в то время как мутантный выглядел менее слизистым, чем родительский штамм. Мутант Tb29 интенсивно адсорбировал краситель и формировал колонии красного цвета.

Флуорохромный краситель Калькофлуор белый специфически связывается с полисахаридами, содержащими β -связи, и флуоресцирует в УФ свете. Отсутствие свечения колоний *R. meliloti* может свидетельствовать о дефектах синтеза ЭПС1 (табл. 1). Для первичной характеристики ЛПС мутанта проводили электрофорез в полиакриламидном геле с ДСН ЛПС из клеточных экстрактов, обработанных протеиназой К. ЛПС родительского штамма СХМ1-188 разделялись на две интенсивно окрашенные зоны, которые обычно наблюдают у *R. meliloti* – ЛПС1 и ЛПС2, представляющие собой S-ЛПС и R-ЛПС соответственно. У мутанта Tb29 отсутствовала медленно мигрирующая зона, соответствующая ЛПС1. Таким образом, штамм Tb29 представлял собой Tn5-мутант *R. meliloti* по синтезу липополисахаридов.

Далее исследовали симбиотический фенотип мутанта на растениях *M. sativa*. Штамм Tb29 формировал розовые азотфиксирующие клубеньки на растениях-хозяевах. Растения люцерны, инокулированные этим мутантом, были зелеными и по виду не отличались от растений, инокулированных родительским штаммом.

Таблица 1. Характеристики роста штаммов *R. meliloti* на селективных средах

Штамм <i>R. meliloti</i>	Окраска колоний на минимальной среде с Конго красным	Рост на среде LB с ДОХ	Свечение в УФ свете на среде LB с Калькофлуором	Слизистость колоний на минимальной среде
СХМ1-188	розовая	+	+	+
Tb 29	красная	-	±	±

В целом, количество клубеньков на растениях, инокулированных мутантом, достоверно не отличалось от количества клубеньков, образованных СХМ1-188 *R. meliloti*. Однако у мутанта Tb29 в начале нодуляционного периода клубенько-образование было замедлено, а в конце эксперимента количество клубеньков было выше, чем у родительского штамма. Такая динамика может свидетельствовать об изменении авторегуляции образования клубеньков со стороны растения-хозяина. Она характерна для

мутантов, образующих неактивные Fix(-) клубеньки, и наблюдалась у *lpsB* мутанта *R. meliloti* [8].

В процессе исследований влияния штаммов азотфиксирующих бактерий *R. meliloti* на растения, инфицированные фитопатогенными представителями молликутов, было проведено морфофизиологическое сравнение образцов *M. sativa* в зависимости от различных комбинаций инфицирования ахлеплазмами и ризобиями (табл. 2).

Таблица 2. Симбиотическая эффективность штаммов *R. meliloti* 425a и Tb29 в условиях микро-вегетации при экспериментальном микоплазмозе люцерны

Масса растений, мг/пробирку		
Моноинокуляция		
<i>R. meliloti</i> Tb29	<i>R. meliloti</i> 425a	стерильно
9,4 ± 1,3	11,2 ± 1,7	7,9 ± 1,7
Совместно с <i>A. laidlawii</i> var. <i>granulum</i> шт. 118		
8,9 ± 1,2	9,8 ± 1,4	8,9 ± 1,3

Установлено, что на начальных этапах (2–3 недели) производственный штамм *R. meliloti* 425a проявлял более высокую симбиотическую эффективность по сравнению с мутантом Tb29. Масса неинфицированных ахлеплазмами растений, инокулированных штаммом 425a, на 19 % превышала показатель варианта с Tb29.

Показано, что внесение в симбиотическую систему, образовавшуюся вследствие инокуляции растений различными штаммами ризобий, культуры фитопатогенной ахлеплазмы через 2–3 недели приводило к отставанию данного варианта в накоплении массы люцерны. Обращает внимание тот факт, что инфицирование ахлеплазмой люцерны без внесения штаммов ризобий, несмотря на пожелтение листьев, приводило к определенной стимуляции растений, что выражалось в эффекте накопления массы люцерны, превышающей массу стерильного контрольного варианта, и сопоставимом с таковым в варианте применения мутантного штамма *R. meliloti* Tb29. Полученный результат соответствует данным А. А. Ваньковой с соавт. (2009), в которых представлено стимулирующее влияние ахлеплазм на растения томатов на ранних этапах их заражения [9].

Далее было проведено измерение вегетативных органов *M. sativa* при внесении *R. meliloti* 425a и Tb29 и инфицировании *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 (табл. 3).

Установлено, что внесение культур микроорганизмов на ранних этапах не влияет на длину и разветвленность корней растений. Измерение высоты растений показало, что в вариантах с инфицированием люцерны ахлеплазмами средняя высота пораженных растений превышала контрольные показатели (стерильные растения) до 1,6 раза. Следует отметить, что это сопровождалось утолщением стеблей, увеличением количества листьев и ширины листовых пластин, что согласуется с данными других авторов [10, 11] и является характерными внешними признаками микоплазменной инфекции. Кроме того, показано, что применение ризобияльных культур сглаживало эти изменения, приближая их к контрольным значениям.

Выводы

Таким образом, благодаря формированию симбиотических связей люцерны с азотфиксирующими штаммами клубеньковых бактерий *R. meliloti* – эффективным производственным 425a и мутантом Tb29 с дефектными липополисахаридами, происходит улучшение состояния и габитуса растений, а также уменьшается негативное влияние на них со стороны фитопатогенного молликута *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118, что проявляется в ослаблении симптомов микоплазмоза.

Авторы выражают глубокую признательность заведующему лаборатории генетики и селекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского Института сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакаде-

мии доктору биологических наук, профессору Борису Васильевичу Симарову за предоставленную возможность проведения генетических исследований мутантов.

Таблица 3. Биометрические показатели растений люцерны в симбиозе с *R. meliloti 425a* и *Tb29* под воздействием *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118

Вариант	Биометрические показатели				
	Длина корня, мм	Высота растения, мм	Количество листьев (ср. из 10)	Длина листа, мм	Ширина листа, мм
Необработанные растения (контроль)	58	43	5,2	5,0	4,1
Растения, инокулированные <i>R. meliloti 425a</i>	60	58	6,7	6,2	4,2
Растения, инокулированные <i>R. meliloti Tb29</i>	58	55	6,6	6,1	4,1
Растения, инокулированные <i>425a</i> совместно с ахелеплазмой	60	70	6,9	5,3	4,3
Растения, инокулированные <i>Tb29</i> совместно с ахелеплазмой	59	68	6,8	5,1	4,4
Растения, инфицированные ахелеплазмой	59	66	7,0	4,7	4,6

Литература

1. Чернов В.М., Чернова О.А., Тарчевский И.А. Феноменология микоплазменных инфекций растений // Физиология растений. – 1996. – Т. 43, № 5. – С. 694–701.
2. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium – Medicago* model // Microbiology. – 2007. – V. 5. – P. 619–633.
3. Frayse N., Couderc F., Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis // Eur. J. Biochem. – 2003. – V. 270. – P. 1365–1380.
4. *Rhizobiaceae*: молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / под ред. Г. Спайк, А. Кондорози, П. Хукас. – Санкт–Петербург, 2002. – 568 с.
5. Затовская Т.В. Получение и анализ Tn5-мутантов *Rhizobium meliloti* с измененными поверхностными полисахаридами: дисс...канд. биол. наук: 03.02.03. – Санкт-Петербург, 2012. – 186 с.
6. Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, № 2. – С. 71–75.
7. Экспериментальна ґрунтова мікробіологія / за наук.ред. В.В. Волгогона. – К.: Аграрна наука, 2010. – 464 с.
8. Lagares A., Caetano-Anolles G., Niehaus K., Lorenzen J., Ljunggren H.D., Puhler A., Favelukes G.A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa // J. Bacteriol. – 1992. – V. 174. – P. 5941–5952.
9. Ванькова А.А., Иванов П.И., Мидяник Г.А., Серебренникова Л.А. Взаимодействие между микоплазмами (*A. laidlawii*) и растениями (*Medicago sativa* и *Lyc. esculentum* Mill) // Известия ТСХА. – 2008. – Вып. 1. – С. 129–133.
10. Власов Ю.И., Самсонова Л.Н., Файзиева Г.Б., Васькин Д.В., Еремин В.Г., Дьячук А.Л. «Ведьмина метла» карликовость люцерны (основные сведения о заболевании, методах изучения, мерах борьбы с ним). – Саратов, 1990. – 90 с.
11. Ванькова А.А., Иванов П.И., Мидяник Г.А. Взаимодействие микоплазм (*A. laidlawii*) с симбиотической системой *Medicago sativa – Rhizobium meliloti* // Агрохимия. – 2009. – № 1. – С. 72–78.

KOROBKOVA K.S., ZATOVSKA T.V., PATYKA V.P.

Zabolotny Institute of microbiology and virology NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotny str., 154, e-mail: kkorobkova@ukr.net

EFFECT OF RHIZOBIUM MELILOTTI TN5 MUTANT WITH CHANGED LIPOPOLYSACCHARIDES ON MANIFESTATION OF ALFALFA MYCOPLASMOSIS

Aim. Improving of plant safety functions by strengthening their physiological state and assimilation of nutrients is of particular importance as environmentally sound way of reducing the harmfulness of plant mycoplasmosis. The aim was to establish the effect of rhizobia including of mutant with modified polysaccharide characteristics which enter into

symbiosis with leguminous plants to the manifestation of experimental mycoplasmosis of plants in the laboratory conditions. **Methods.** Tn5-transposon mutagenesis, polyacrylamide gel electrophoresis, microbiological methods, microvegetation experiment, biometric measurements. **Results.** From typical highly effective strain *Rhizobium meliloti* 425a it was obtained mutant Tb29 which differed from the parent strain on the synthesis of lipopolysaccharide. *Medicago sativa* plants inoculated by mutant were green and did not differ from plants with the parent strain. Acholeplasma infection of alfalfa without rhizobia treatment led to a certain stimulation of plants, that was manifested in some increasing of plant mass and size, but simultaneously causing symptoms of yellowing and leaf shape change. **Conclusions.** Formation of symbiotic relationships between *M. sativa* and *R. meliloti* 425a and Tb29 led to improvement of plant state and reduces the negative effect of plant pathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118.

Keywords: mollicutes, plant pathogenic acholeplasma, rhizobia, mutant, lipopolysaccharides.