

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ УРАЖЕННЯ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ І СТАН ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ СОРТУ СМУГЛЯНКА

Гуляєва Г.Б., Токовенко І.П., Осипенко Б.О., Патика В.П.  
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного  
Національної академії наук України

Стаття присвячена дослідженню впливу штучного ураження *Acholeplasma laidlawii* шт. 118 на функціональну активність і стан фотосинтетичного апарату рослин озимої пшениці сорту Смуглянка. Встановлено, що разом із інгібуванням росту пагонів рослин озимої пшениці, уражених ахолеплазмою, знижується площа листків та вміст в них хлорофілу *a* і *b* при зростанні вмісту каротиноїдів. Також встановлено зниження вмісту термінальних оксидаз – каталази й пероксидази в листових пластинках. Методом індукції флуоресценції хлорофілу показано, що в листках інфікованих рослин протікають процеси деградації пулу акцепторів хімічної природи ФСII, що приймають участь у лінійному транспорті електронів за збільшення пулу Qb-невідновлювальних комплексів. Встановлено суттєве зниження відносної кількості квантів світла, що залучається у процесах темної фіксації вуглецю.

**Ключові слова:** *Acholeplasma laidlawii*, фітомікоплазма, *T. Aestivum* L., озима пшениця, хлорофіл, флуоресценція хлорофілу.

**Постановка проблеми.** Агроекосистеми порівняно із природними біоценозами характеризуються нестабільністю і зниженою здатністю протистояти впливу негативних чинників, оскільки в них порушена біологічна рівновага системи паразит-хазяїн [1, с. 61]. Тому вплив фітопатогенних мікроорганізмів на рослину завдає значної шкоди сільськогосподарському виробництву, втрати урожаю від яких сягають від 30 до 50% і більше, коли захворювання приймають характер епіфітотій. Однією із найактуальніших проблем цього напрямку вважається ураження сільськогосподарських рослин мікоплазмами. Ураження цими патогенами може набувати катастрофічного характеру, знижуючи урожай зерна такої важливої сільськогосподарської культури як пшениця майже до 90% [9, с. 3].

Таким чином, захист рослин до якого відноситься ціла низка заходів: агротехнічні, хімічні, біотехнологічні, зокрема, селекційні є невід'ємним елементом агротехнології будь-якої сільськогосподарської культури. Але з іншого боку, завдяки значній хімізації технологічних процесів і мутаційній мінливості фітопатогенних мікроорганізмів, актуальною є проблема порушення балансу складових агроекосистем [1, с. 62]. Тому, поряд із селекцією стійких сортів важливе значення має дослідження фізіологічних особливостей впливу фітопатогенних мікроорганізмів на рослину в системі хазяїн-фітопатоген і сорт-патоген-агрофітоценоз. В цьому ж напрямку важливою є розробка ранньої діагностики впливу фітопатогенних факторів на рослину і визначення механізмів дії імунітету рослини, що може дати інформацію для визначення шляхів до створення нових технологій захисту рослин або зниження дії фітопатогенних факторів.

Відомо, що найважливішою ланкою у продукційному процесі рослин є фотосинтетична активність листків, що досить тісно корелює із господарською продуктивністю рослин [6]. Також відомо, що найбільш руйнівного впливу за ураження *Acholeplasma laidlawii*, що викликає жовту карликовість пшениці завдається фотосинтетичному апарату рослин [9, 13].

Зазвичай, визначення інтенсивності фотосинтезу проводять газометричним методом. Але, на сьогодні, з цією метою все частіше застосовують метод індукції флуоресценції хлорофілу, який досить зручний завдяки своїй експресивності та не потребує деструкції об'єкта дослідження [2, 4, 6, 7].

В той же час, такі складні й трудомісткі методи для визначення інфікування *Acholeplasma laidlawii*, як ПЦР-аналіз не завжди ефективні, зокрема, на ранніх етапах інфікування рослин (менш, ніж 2 тижні) [9, с. 10].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми.** Попередніми дослідженнями встановлено, що за ураження фітопатогенною ахолеплазмою змінюється метаболізм рослини хазяїна, що призводить до надмірного накопичення крохмалю й руйнування хлоропластів, зменшення кількості хлорофілу. Встановлено надмірне накопичення позаклітинної фруктозо-1,6-бісфосфатази в листках, що спотворює механізм субстрат-ферментного регулювання [13].

Численні дослідження присвячені з'ясуванню молекулярно-біологічних механізмів взаємодії патоген-хазяїн, закономірностям персистенції ахолеплазм, індукції фітоімунітету рослин, дослідженню компонентів захисної системи рослин, сигнальних молекул, зокрема, ліпооксигеназної системи [8, 11, 12]. Досліджено вплив мікоплазмової інфекції на жирнокислотний склад загальних ліпідів та морфологію клітин калусів рослин [8].

**Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким присвячується стаття.** Останнім часом для всебічного вивчення інфекційного процесу дослідники використовували дві їх складові – патогена і клітин організму-господаря у динаміці їх взаємодії у випадку мікоплазмозу рослин. При цьому застосовувався метод сумісного культивування фітопатогенних ахолеплазм і рослинних клітин (або інфікування в умовах *in vitro*), яка є найбільш спрощеною модельною системою для дослідження стосунків хазяїна і паразита. Але для всебічного вивчення інфекційного процесу цього не достатньо. Так, на сьогоднішній день відсутні публікації щодо дослідження впливу штучного ураження фітопатогенних ахолеплазм на функціональну активність і стан фотосинтетичного апарату рослин.

Тому метою наших досліджень було визначення фізіологічних особливостей впливу на метаболізм рослини в патосистемі «рослина-хазяїн-фітопатоген», зокрема стан фотосинтетичного апарату й активність фотосинтетичної системи за використання як стандартних фізіолого-біохімічних методів, так і експрес-методу індукції флуоресценції хлорофілу.

**Матеріали і методи.** Дослідні рослини вирощували у модельному лабораторному досліді. У якості об'єкту

Таблиця 1

**Вплив фітомікоплазму на пігментний склад листків 9-ти добових рослин озимої пшениці**

Варіанти	Пігменти				
	Хл. a, мг/г	Хл. b, мг/г	Хл. a+b	Каротиноїди, мг/г	Хл. a / Хл. b
Контроль	0,75±0,03	0,47±0,02	1,54±0,06	0,22±0,01	1,60±0,06
Інфікування (метод Клемента)*	0,66±0,03	0,33±0,01	1,24±0,05	0,33±0,01	2,00±0,10

Примітка: \*-7-а доба від початку інфікування

в модельній системі використовували рослини озимої м'якої пшениці *T. Aestivum L.* сорту Смуглянка.

Насіння озимої пшениці замочували в чашках Петрі по 50 шт і витримували у термостаті при температурі 25°C. Із загальної маси відбирали добові проростки 1-1,5 см довжиною й інфікували їх методом Клемента (субепідермальна ін'єкція) розчином із вмістом *Acholeplasma laidlawii* шт. 118, яка одержана з Української колекції мікроорганізмів ІМВ. Проростки саджали в попередньо підготовлені пластикові стаканчики, заповнені ґрунтосумішшю «Універсальна» за схемою: 1 – контроль (неінфіковані рослини); 2 – інфікування: субепідермальна ін'єкція (метод Клемента) *Acholeplasma laidlawii* шт. 118. Рослини вирощували до 19-ти добового віку. Виміри довжини пагонів і розрахунок їх приросту проводили на 6-и, 11-и і 19-и добових рослинах. Пігментний склад листків визначали методом екстракції у ДМСО з подальшою спектрометрією [16]. Активність фотосинтетичної системи нативних рослин досліджували методом індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) за допомогою портативного приладу вітчизняного виробництва «Флоратест» [10]. Статистичну обробку робили з використанням програми SPSS 13.0.

**Результати і обговорення.** У 86% рослин озимої пшениці, інфікованих шляхом субепідермальної ін'єкції (метод Клемента) протягом всього строку спостереження, переважало відставання в рості до 29%, та лише у 14% 19-ти добових рослин спостерігались значні анатомічні аномалії.

Інфікування ахолеплазмой призводило до пригнічення приросту пагонів на 31% за добу й зниження площі асиміляційної поверхні листків 19-ти добових уражених рослин на 27%. Співвідношення мас листки/корені за цих умов також суттєво знижувалося – на 32%. Фітотоксичний ефект за довжиною листків складав майже 45%. Отже, найбільш шкодочинного ефекту на початкових стадіях ураження зазнав фотосинтетичний апарат рослин.

Цитологічні дослідження мезофілу дослідних рослин озимої пшениці за допомогою світлового мікроскопу (1000x) дозволили виявити в інфікованих ахолеплазмой тканинах листків патологічні включення, деформації судин та зміни кольору хлоропластів.

Важливим показником, що характеризує стан фотосинтетичного апарату є пігментний склад листків (табл. 1).

Проведений аналіз виявив зниження вмісту суми хлорофілів a+b інфікованих рослин на 9,5%. Вміст пігментів, що є поліненасиченими сполуками терпенового ряду – каротиноїдів, що як відомо входять до складу антенних комплексів і реакційних центрів й захищають фотосинтетичний апарат від фотоокиснення, зростає вдвічі. За літературними даними також відомо, що ефективність переносу сигналу збудження між молекулами хлорофілу досягає 100, а між молекулами каротину й хлорофілу – лише 40% [14], тобто можна передбачити сповільнення швидкості міграції енергії збудження по пігментній матриці.

Зростання співвідношення хл. a/b за цих умов відбувалося за більш стрімкого зниження вмісту хл.

b, ніж хл a й вказує на більшу відносну частку пігментів у складі ФС I [7].

Проявом захисних функцій рослинного організму є зростання активності термінальних оксидаз, що входять до складу антиоксидантної системи, зокрема каталази і пероксидази. Їх синтез індукується у відповідь на підвищення вільних радикалів. Зокрема, каталаза відповідає за розкладання перикису та є фактором, що бере участь у регуляції змін фаз аеробних і анаеробних процесів, окислення перекисів в пероксисомах при фотодиханні. Пероксидаза, також пов'язана з цілим рядом метаболічних перетворень у клітині [14].

Визначення ферментативної активності каталази і пероксидази листків уражених рослин пшениці показало зниження їх активності (табл. 2).

Таблиця 2

**Вплив фітомікоплазму на активність термінальних оксидаз листків 9-ти добових рослин озимої пшениці**

Варіанти досліджу	Активність термінальних оксидаз	
	Каталаза (І.ІІ.6), мл O <sub>2</sub> ×г <sup>-1</sup> ×хв <sup>-1</sup>	Пероксидаза (І.ІІ.7), ΔD <sub>670</sub> г <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
Контроль	4,70±0,18	3,58±0,14
Інфікування (метод Клемента)	4,68±0,16	3,15±0,15

Примітка: \*- 7-а доба від початку інфікування

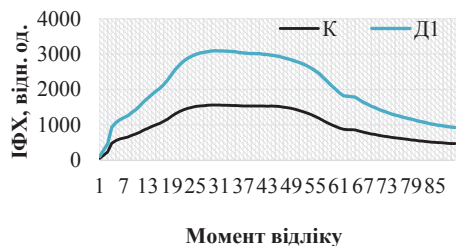
За літературними даними, у дослідях на озимій пшениці було встановлено зниження активності СОД за ураження *A. laidlawii* PG8 [9, с. 11]. Отже, при взаємодії рослини із даним патогеном знижується специфічна стійкість рослинного організму до абіотичних факторів [15]. Але є дані, що патогенні мікоплазми активують неспецифічну стійкість, зокрема, зростає вміст АМК, деградація ліпідів і біополімерів, відмічається активація ПОЛ та збільшення вмісту нітритів, а також спостерігається тимчасове активування синтезу вільних фенольних сполук [8, 9, 11].

Для визначення дії фітомікоплазмой на активність фотосинтетичного апарату листків рослин озимої пшениці ми застосовували метод індукції флуоресценції хлорофілу, параметри якого фіксували портативним приладом вітчизняного виробництва «Флоратест» [10].

Можливість застосування цього методу у якості експрес-оцінки фотосинтетичного апарату рослин обумовлено тим, що випромінювання поглинутих фотосинтетичними пігментами квантів світла шляхом флуоресценції обернено корелює із їх залученням у процесі фотоасиміляції СО<sub>2</sub>. Тому порушення фотосинтезу викликають характерні зміни «кривої» флуоресценції, або так званої Кривої Каутського, яка має стаціонарний вигляд. Тому аналіз змін відповідних її відрізків, що позначається на певних термінальних параметрах цієї кривої є маркерними для змін ефективності перебігу як окремих ланок фотосинтезу так і його ефективності в цілому [7, с. 29].

Провівши серію вимірів, ми отримали усереднені показники індукції флуоресценції хлорофілу,

графічне відображення якої (у вигляді Кривої Кавтського) наведено на малюнку (рис. 1).



**Рис. 1.** Вплив інфікування ахолеплазмою 17-ти добових рослин озимої пшениці на інтенсивність флуоресценції хлорофілу (ІФХ) (К – контроль; Д1 – інфікування ахолеплазмою методом Клемента (15-та доба від початку інфікування))

Результати аналізу деяких основних параметрів цієї кривої дали змогу охарактеризувати вплив патогенних ахолеплазм на активність фотосинтетичного апарату інфікованих рослин. Зокрема, зниження показника  $F_0$  (фонові флуоресценції, що йде при відкритих реакційних центрах) на 8,3% порівняно з контролем, свідчить про зменшення кількості хлоропластів у клітинах та руйнування їх структури за впливу патогена [7, с. 24]. Параметр  $F_m$ , що відповідає максимальній флуоресценції при закритих реакційних центрах на контролі становив 1564,8 й знижувався до значення 1532,8 в листках інфікованих рослин. Його зниження, звичайно пов'язують із редукцією кількості й руйнуванням структури хлоропластів, а також із сповільненням їх ресинтезу [6]. Зазвичай коефіцієнт індукції флуоресценції хлорофілу  $K_i$  використовують як показник потенційної ефективності фотохімії ФСЦ, що визначається як  $(F_m - F_0) / F_m$ . В наших дослідах цей параметр мав тенденцію до збільшення і зростає за інфікування на 4,3%. Але ФСЦ досить гетерогенна і до її складу входить також частина світлозбираючої антени, що не приймають участь у лінійному транспорті електронів – так звані  $Q_b$ -невідновлювальні комплекси, частка яких зростає при стресі [7, с. 130]. Для розрахунку їх кількості використовується параметр  $K_{pi}$ , що визначається як  $(F_{pi} - F_0) / (F_m - F_0)$  [2, с. 6]. Розрахунок цього показника виявили суттєве його зростання у інфікованих ахолеплазмою рослин – на 12,5% порівняно із контролем.

Інколи цей показник ще застосовують для визначення наявності вірусної інфекції в рослинах, порівнюючи його із гранично допустимою нормою (0,40) [4]. У випадку інфікованих ахолеплазмою рослин цей показник становив 0,54. Отже, ефект ураження ахолеплазмою за  $K_{pi}$  фіксується як вірусний, але ця гіпотеза потребує додаткових досліджень. Найбільш суттєво зростала інтенсивність флуоресценції хлорофілу на відрізу кривої, що корелює із інтенсивністю темної фіксації вуглецю. Цей параметр визначається як  $(F_m - F_t) / F_t$ , де  $F_m$  визначається як максимум на спаді кривої ІФХ [2, с. 6]. Таку реакцію фотосинтетичного апарату можна пояснити вбудовуванням патогену у донорно-акцепторну систему рослини й порушення системи фермент-субстратної регуляції метаболізму рослини.

**Висновки.** Встановлено, що фотосинтетичний апарат рослин на початкових етапах фітомікоплазмозного ураження характеризується певними адаптивними перебудовами пігментного складу листків: зниженням вмісту хл. а та хл. b і зростанням додаткових пігментів із захисною функцією – каротиноїдів. Отже, збільшення додаткових фотосинтетичних пігментів є адаптогенною реакцією в умовах конкуренції за асиміляти між рослиною хазяїном і фітопатогеном, що сприяє підвищенню стійкості фотосинтетичного апарату до фотоокиснення, але знижує потенційну швидкість передачі сигналу збудження по пігментній матриці. При цьому відмічали зниження активності основних термінальних оксидаз, що беруть участь у формуванні рослинної фітостійкості – каталази й пероксидази.

Показано, що інфікування рослин озимої пшениці фітомікоплазмозом вже на ранніх етапах розвитку викликає морфо-фізіологічні і біохімічні зміни, викликані вбудовуванням патогену у донорно-акцепторну систему рослини і порушенням субстратного регулювання рослинного метаболізму, внаслідок чого відбувається зниження продуктивного використання квантів світла в процесі фотосинтезу і темної фіксації вуглецю.

Метод ІФХ є досить експресивним й інформативним для оцінки й дослідження дії патогенних мікроорганізмів та виявлення функціональних ланок фотосинтетичної системи, що зазнали шкодочинного впливу й визначення тригерів поліпшення фітоімунітету рослини-хазяїна.

## Список літератури:

1. Агроєкологія: навч. посібник / [О.Ф. Смаглій, А.Т. Кардашов, П.В. Литвак та ін.]; за ред. Н.А. Серебрякова. – К.: «Вища освіта», 2006. – 671 с.
2. Брайон О.В. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу: Методичні вказівки для студентів біологічного факультету / О.В. Брайон, Д.Ю. Корнєєв, О.О. Снегур, О.І. Китаєв / – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2000. – 15 с.
3. Воскресенская О.Л. Большой практикум по биоэкологии. Ч. 1: учеб. пособие / Воскресенская О.Л. / Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2006. – 107 с.
4. Олексійченко Н.О. Особливості індукції флуоресценції хлорофілу в листках деревних рослин в умовах урбанізованого середовища / Н.О. Олексійченко, О.І. Китаєв, М.О. Совакова [та ін.] // Біоресурси і природокористування: науковий журнал. – 2013. – Т. 5, № 5/6. – С. 107-112.
5. Гуляев Б.И. Фотосинтез и продуктивность растений: проблемы, достижения, перспективы исследований / Б.И. Гуляев // Физиол. и биохим. культур. раст. – 1996. – № 1/2. – С. 15-35.
6. Карапетян Н.В. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений / Н.В. Карапетян, Н.Г. Бухов // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 5. – С. 1013-1026.
7. Корнєєв Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнєєв / Киев: Альтерпрес, 2002. – 191 с.
8. Коробкова К.С. Вплив мікоплазмозної інфекції на жирнокислотний склад загальних ліпідів та морфологію клітин калюсів пшениці / К.С. Коробкова, Л.П. Панченко, А.М. Онищенко [та ін.] // Мікробіологія і біотехнологія. – № 1. – 2010. – С. 62-65.
9. Мухамедшина Н.Е. Фитопатогенность и адаптация к неблагоприятным условиям роста *Acheloplazma Laidlavii* PG8: автореф. дисс. канд.биол. наук.: спец. 03.00.12 – физиология и биохимия растений, 03.00.07 – микробиология / Н.Е. Мухамедшина – Казань: Казанский ин-т биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 2006. – 24 с.
10. Портативний флуорометр «Флоротест»: настанова з експлуатації. – Інститут Кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України, 2013. – 24 с.

11. Січкач С.В. Вплив глікокаліксу клітин молікутів на активність окремих антиоксидантних ферментів калюсних тканин цукрового буряку / С.В. Січкач, К.С. Коробкова // Тези доповідей XII з'їзду Товариства мікробіологів України. – Ужгород, 2009. – С. 338.
12. Січкач С.В. Активність окислювальних ферментів рослинних клітин за умов експериментального мікоплазмозу / С.В. Січкач, К.С. Коробкова // Мікробіол. журн. – 2011. – Т. 73, № 2. – С. 24-28.
13. Скрипаль І.Г. Спосіб одержання позаклітинної фруктозо-1,6-бісфосфатази – основного фактора патогенності фітоплазм (на моделі збудника блідо-зеленої карликовості зернових культур) / І.Г. Скрипаль, І.П. Токовенко, Л.П. Маліновська // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 3. – С. 89-97.
14. Якушкина Н.И. Физиология растений. Он-лайн энциклопедия (электронный ресурс) / Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бактенко, 2010-2013 // – режим доступа до журналу: fizrast.ru (<http://fizrast.ru/fotosintez/etapy/fotofizika.html>) – название с экрана.
15. Allen R.G. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation / R.G. Allen // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1991. – Vol. 196. – P. 117-129.
16. Hiscox J.D. The method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration / J.D. Hiscox, R.J. Israelstam // Can. J. Bot. – 1979. – V. 57, № 12. – P. 1332-1334.

**Гуляева А.Б., Токовенко И.П., Осипенко Б.О., Патыка В.Ф.**  
 Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного  
 Национальной академии наук Украины

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНФИЦИРОВАНИЯ ACHOLEPLASMA LAIDLAWII НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ СОРТА СМУГЛЯНКА

### Аннотация

Статья посвящена исследованию влияния искусственного инфицирования *Acholeplasma laidlawii* шт. 118 на функциональную активность и состояние фотосинтетического аппарата растений озимой пшеницы сорта Смуглянка. Установлено, что вместе с ингибированием роста проростков растений озимой пшеницы, инфицированных ахолеплазмой, снижается площадь поверхности листьев и содержание в них хлорофилла *a* и *b* при увеличении содержания каротиноидов. Так же установлено снижение содержания в тканях листьев терминальных оксидаз – каталазы и пероксидазы. Методом индукции флуоресценции хлорофилла показано, что в листьях инфицированных растений протекают процессы деградации пула акцепторов хиноновой природы ФСII, берущих участие в линейном транспорте электронов, характеризующиеся увеличением пула Qb-невосстанавливающих комплексов. Установлено существенное уменьшение относительного количества квантов света, принимающих участие в процессах темновой фиксации углерода.

**Ключевые слова:** *Acholeplasma laidlawii*, фитомикоплазмоз, *T. Aestivum* L., озимая пшеница, хлорофилл, флуоресценция хлорофилла.

**Gulaeva A.B., Tokovenko I.P., Osipenko B.O., Palyka V.F.**  
 D.K. Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology  
 of the National Academy of Sciences of Ukraine

## INVESTIGATION OF INFLUENCE ACHOLEPLASMA LAIDLAWII ON FUNCTIONAL ACTIVITY AND STATE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PLANTS OF WINTER WHEAT VARIETIES SMUGLYANKA

### Summary

The article investigates the influence of artificial infection *Acholeplasma laidlawii* strain 118 on the functional activity and the state of the photosynthetic apparatus of plants of winter wheat varieties Smuglyanka. Found inhibiting growth of plant seedlings infected *Acholeplasma laidlawii* strain 118 of plants of winter wheat, as well as reduction of the surface area of the leaves and the content of chlorophyll *a* and *b* with increasing content of carotenoids. It is established the reduction of leaf tissue of terminal oxidases – catalase and peroxidase.

By chlorophyll fluorescence induction method, it is shown that the leaves of infected plants are processes of degradation of the quinone pool acceptor nature PSII taking part in the linear transport of electrons, characterized by an increase in non-reducing Qb-pool complexes. It was founded a significant decrease in the relative number of photons involved in the processes of dark carbon fixation.

**Keywords:** *Acholeplasma laidlawii*, phytopathogenical mycoplasmas, *T. Aestivum* L., winter wheat, chlorophyll, chlorophyll fluorescence.