

УДК 576.851.155

А. М. Петак, Г. Л. Ковтунович, Н. А. Козыровская, А. И. Туряница, В. А. Кордюм

Взаимоотношения бактерий рода *Klebsiella* с растением.

2. Локализация бактерий *K. oxytoca* и *K. terrigena* в тканях табака и пшеницы

Бактерии *K. oxytoca* 13183, VN13, M5a1-47, *K. terrigena* 80-07, меченные генами биолюминесценции (*lux*) *Photobacterium leiognathi*, способны локализоваться внутри тканей листьев и корней табака и пшеницы. В тканях корня регенерантов табака и пшеницы обнаружено на порядок меньше бактерий, чем на поверхности растения. Потеря *lux*-генов в клетках бактерий, локализованных в тканях растений, меньше 1%, что значительно ниже по сравнению с клетками непрерывной культуры. Локализация бактерий *K. oxytoca* VN13 и *K. terrigena* 80-07 внутри корня пшеницы, обнаруженная методом биолюминесценции, подтверждена электронно-микроскопическим анализом. Показана стабильность искусственной ассоциации табак - *K. oxytoca* VN13 при субкультивировании и сохранение ассоциативных взаимодействий при переходе лист — побег → лист — побег.

Введение. Некоторые виды бактерий рода *Klebsiella* известны как сапрофиты, ассоциированные с растением. Бактерия *K. oxytoca* и *K. planticola* усваивают азот атмосферы и, конвертируя его в органические соединения, снабжают «биологическим» азотом растения [1]. Кроме того, бактерии указанных видов способны синтезировать ауксины [2] и стимулировать рост растения. У бактерии *K. oxytoca* обнаружена способность колонизировать внутренние ткани злаковых [3]. В предыдущей публикации из данной серии сообщалось, что *K. oxytoca* проникает в корни проростков риса и локализуется на ранней стадии их развития в периферическом слое клеток. Способность этих бактерий проникать в ткани растений наряду с наличием у них полезных для растения свойств выделяет их из круга свободноживущих микроорганизмов как перспективный объект для практического использования, поскольку они занимают уникальную нишу и, таким образом, уходят от конкуренции с почвенными бактериями за источники энергии. В связи с вышеизложенным представляется необходимым изучение механизмов взаимодействия бактерий рода *Klebsiella* с растением-хозяином, начиная с уровня организма и клетки и заканчивая молекулярным уровнем. Целью настоящей работы было изучение способности некоторых видов бактерий рода *Klebsiella*, имеющих полезные для растения свойства, проникать в ткани табака и пшеницы.

Материалы и методы. В данном исследовании использовали ряд видов клебсиелл, изолированных из ризосферы растений (*K. oxytoca* 13183, *K. terrigena* 80-07), из внутренних тканей корня риса (*K. oxytoca* VN13), анти-мутант бактерии *K. oxytoca* M5a1-47, любезно предоставленный проф. Д. Клейнером (ФРГ), клинические изоляты *K. pneumoniae* 1470 и *K. ozaenae* 5051, а также *Escherichia coli* JM109, используемым в качестве негативного контроля. Указанные бактерии трансформировали плазмидой pKAS18*Lux* [4], как описано ранее [5]. Полученные трансформанты (*Lux*⁺)

отбирали по способности бактерий излучать видимый свет на среде с канамицином, устойчивость к которому кодируется плазмидой *pKAS18Lux*. Стабильность плазмиды в клетках трансформантов определяли в непрерывной культуре после 100 генераций, высевая аликвоту бактериальной суспензии на агар без антибиотиков с последующей репликой колоний на среду с канамицином, устойчивость к которому кодируется плазмидой. Растения табака культивировали в условиях культуры *in vitro*. Листовые эксплантаты табака нарезали полосками шириной 3—4 мм и помещали в чашки Петри. Для инокуляции эксплантатов использовали бактериальные культуры в концентрации 10⁹ кл/мл. Период инкубации табака с суспензией бактерий составлял 2,5 ч, после чего избыток бактерий удаляли стерильной бумагой, а эксплантаты помещали на агаризованную среду Мурасиге и Скуга (МС) [6]. Контролем служили эксплантаты, обработанные стерильной дистиллированной водой. Через 24 ч эксплантаты пересаживали на среду для регенерации [7], содержащую 500 мг/л клафорана и 50 мг/л канамицина для индукции органогенеза и предупреждения бактериального зароста. Через две недели растения-регенеранты, появившиеся на обработанных эксплантатах, изучали на присутствие бактерий с люминесцентным фенотипом. Для этого корни и листья (по 50 мг) стерилизовали с поверхности в течение 2 мин раствором диацета, промывали стерильной дистиллированной водой, измельчали в стерильной ступке и высевали на полноценную агаризованную среду. Появившиеся колонии регистрировали в затемненной комнате. Для определения стабильности *lux*-плазмиды колонии, не излучающие свет, методом реплик переносили на среду с канамицином, устойчивость к которому детерминируется плазмидой.

Кроме листовых эксплантатов табака, в экспериментах использовали зрелые зародыши пшеницы. Выделенные зародыши помещали в чашки Петри, орошали суспензией бактерий (10 мкл, 10⁸ кл/мл). Период инкубации зародышей пшеницы с суспензией бактерий составлял 1,5 ч. Далее зародыши помещали в среду МС на сутки, а затем пересаживали в небольшие стаканчики на ту же среду с добавкой клафорана. На 7-й и 14-й дни в проростках определяли наличие бактерий с люминесцентным фенотипом. Подготовку образцов корней двухнедельных проростков пшеницы для электронно-микроскопического анализа проводили, как описано ранее [8].

Результаты и обсуждение. Эффективность метода биолюминесценции для изучения внутриклеточной локализации бактерий отработывали на модели стерильная культура *Nicotiana tabacum* — *K. oxytoca* VN13. Учитывая, что лист является самодифференцирующимся органом и представляет собой хороший объект для исследования взаимодействия растения-регенеранта с эндофитными бактериями, для заражения табака использовали бактерию, меченную *lux*-генами. В контрольном варианте для заражения использовали *E. coli* JM109 *Lux*⁺. Количество бактерий, выделенных из необработанных стерилантом тканей двухнедельных регенерантов табака, составляло 6·10⁴ кл/г сырой массы, из них 87—92 % имели люминесцентный фенотип. Бактерий, чувствительных к канамицину, детерминированному плазмидой *pKAS18Lux*, не обнаружено. Это свидетельствует о том, что при развитии бактерий, меченных *lux*-генами, в контакте с растением векторная часть плазмиды стабильна, а *lux*-гены сегрегируют у 8—13 % клеток популяции. Результаты изоляции бактерий *K. oxytoca* VN13 из поверхности простерилизованных регенерантов табака показали ее присутствие в корнях и листьях табака в количестве, на порядок ниже, чем на поверхности. В листьях удельное количество клеток составляло 200—220 кл/г сырой массы, что 2 раза меньше, чем в корнях. Нестабильность *lux*-маркера в клетках *K. oxytoca* VN13, локализованной внутри ткани табака, была значительно ниже, чем у бактерий, изолированных с поверхности (1 %).

Это может быть связано с более длительным периодом между актами деления у бактерий, локализованных внутри растения.

В предварительных исследованиях по изучению эффекта различных видов клебсиелл (в том числе клинических изолятов) на регенерацию растений показано, что бактерии, имеющие эволюционную связь с растением (*K. oxytoca*, *K. terrigena*), активно влияли на регенерационные процессы (сокращался период регенерации, раньше наступал интенсивный органогенез), а также стимулировали рост стеблей и корней регенерантов [9]. В связи с этим представлялось интересным проследить сохранение бактериальной популяции внутри растения при субкультивировании. Для этого листья регенеранта табака (1 месяц), инфицированного бактерией *K. oxytoca* VN13, использовали для получения растений II поколения. Из регенерантов нового поколения (2 недели) была выделена бактерия как из корней, так и из листьев в таком же количестве, как из двухнедельного регенеранта I поколения. Это свидетельствует о том, что бактерии эффективно колонизируют внутренние ткани табака и, пройдя через два цикла лист — побег, сохраняют бактерии *K. oxytoca* VN13 на поверхности и в тканях. Последнее может применяться в практике микроклонирования растений для получения посадочного материала, инфицированного хозяйственно ценными бактериями. С одной стороны, бактерии благоприятно воздействуют на развитие клонов, улучшая их регенеративную способность и вегетационные характеристики, с другой — регенерированные растения сохраняют достаточное количество бактерий в тканях, чтобы при интродукции их в почву давать положительный эффект.

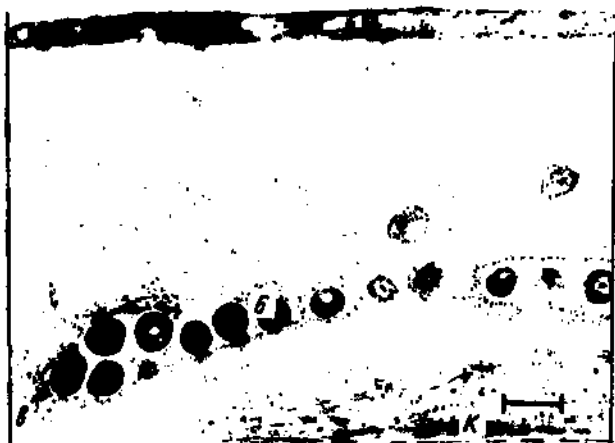
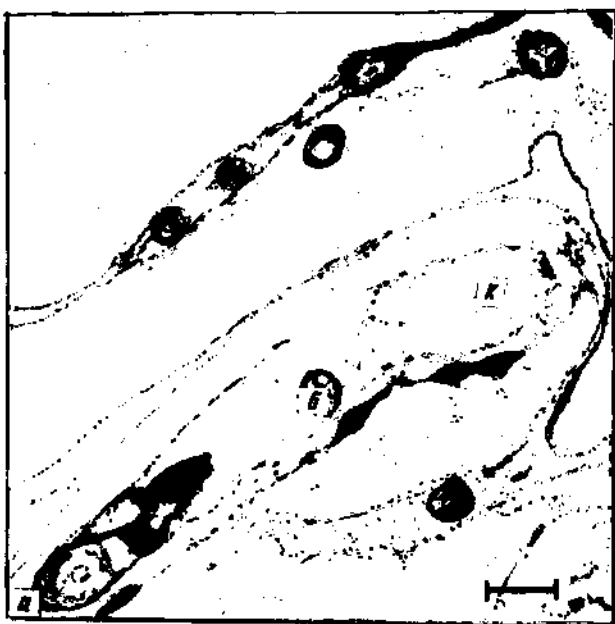
Параллельно анализировали присутствие бактерий *E. coli* JM109 *Lux*⁺ внутри тканей табака. Из простерилизованных с поверхности корней и листьев табака бактерии не выделялись, так же как и из необработанных бактериями контрольных растений-регенерантов.

Таким образом, показано, что *lux*-маркер, присутствующий на плазмиде *pKAS18*, довольно стабилен в клетках бактерии *K. oxytoca* VN13, локализованной в тканях растения-хозяина. Чувствительность метода (1 кл./10 мг ткани) позволяет использовать его для идентификации бактерий, локализованных внутри тканей растения.

Биолюминесцентную метку применяли для идентификации бактерий других видов бактерий рода *Klebsiella* внутри тканей растения. Для этого стерильные зародыши пшеницы заражали культурами бактерий *K. oxytoca* VN13, *K. oxytoca* M5a1-47, *K. oxytoca* 13183, *K. terrigena* 80-07, *K. pneumoniae* 1470, *K. ozaenae* 5051, трансформированные плазмидой *pKAS18Lux*. Из внутренних тканей корней 2—4-недельных проростков пшеницы не выделены лишь *K. pneumoniae* и *K. ozaenae*. Удельное количество бактериальных клеток, выделенных из корней, колебалось от 10^3 до 10^6 клеток на 1 г сырой массы корня в зависимости от вида бактерий. Наиболее активно проникали в корни пшеницы *K. oxytoca* M5a1-47 и *K. terrigena* 80-07. Поверхность корней побегов пшеницы была густо заселена бактериями, количество которых достигало в разных случаях 10^4 — 10^5 кл./г корня.

Полученные данные дают основание предположить, что бактерии, связанные с растением (*K. oxytoca*, *K. terrigena*), имеют ферментативный аппарат, позволяющий им проникать внутрь тканей растения-хозяина. Виды клебсиелл, выделенные от животных или человека (*K. pneumoniae*, *K. ozaenae*), по-видимому, не имели его или утратили в результате приспособления к существованию в новой экологической нише.

Для подтверждения внутритканевой локализации бактерий *K. oxytoca* VN13 и *K. terrigena* 80-07 использовали метод электронной микроскопии. Результаты анализа образцов корней двухнедельных проростков пшеницы,



Локализация бактерий *K. terrigena* 80-07 в корнях проростков пшеницы: в периферическом слое клеток (а); в межклетниках (б); в клеточных оболочках (в). Б — бактерии; К — клетки растения

инфицированных этими бактериями, показывают их присутствие в клетках периферического слоя тканей корня (рисунок, а), в клеточных оболочках (рисунок, в) и межклетниках (рисунок, б). Бактерии представляют собой электронно-плотные клетки, что свидетельствует об их физиологической активности. Внутри тканей и клеточных стенок бактерии располагаются чаще кластерами. Таким образом, данные электронно-микроскопического анализа корней пшеницы, инфицированной бактериями *K. oxytoca* VN13 и *K. terrigena*, подтверждают данные о локализации их внутри тканей корня пшеницы, полученные с помощью биоломинесцентной метки.

Локализация бактерий рода *Klebsiella* внутри корня растения, обнаруженная с помощью метода биоломинесценции и подтвержденная методом электронной микроскопии, свидетельствует о том, что способность бактерий проникать в растение и существовать в нем без нанесения вреда — явление в природе не уникальное. Однако направление, связанное с изучением эндофитных бактерий, лишь недавно начало развиваться, поэтому в настоящее время известно немного непатогенных бактерий, способных проникать внутрь растения [10—13]. Идентификация эндофитных бактерий была затруднена из-за трудоемкости таких существующих методов обнаружения бактерий в тканях, как электронная микроскопия, иммуногистохимический анализ. Использование экспресс-метода биоломинесценции значительно облегчит поиск эндофитных бактерий, перспективных для практического использования.

Г. М. Петак, Г. Л. Ковтунович, Н. О. Козировская, А. І. Туряниця, В. А. Кордюм

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* С РАСТЕНИЕМ.

2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ *K. OXYTOCA* И *K. TERRIGENA* В ТКАНИНАХ ТАБАКА И ПШЕНИЦЫ

Резюме

Бактерии *K. oxytoca* 13183, VN13, M5a1-47, *K. terrigena* 80-07, меченые генами биоломинесценции (*lux*) *Photobacterium leiognathi*, способны локализоваться в срединной ткани листа и корня табака и пшеницы. У тканях корня регенерантов табака и пшеницы найдено на порядок меньше бактерий, чем на поверхности растений. Втрата *lux*-генов у клетках бактерий, локализованных у тканей растений, меньше 1%. Это значительно ниже по сравнению с клетками непрерывной культуры. Локализация бактерий *K. oxytoca* VN13 и *K. terrigena* 80-07 в срединной ткани корня пшеницы, выявлена методом биоломинесценции, подтверждена электронно-микроскопическим анализом. Показана стабильность искусственной ассоциации табак — *K. oxytoca* VN13 при субкультивировании и збереження асоціативних взаємодій при переході лист — пагон → лист — пагон.

А. М. Петак, Г. Л. Ковтунович, Н. А. Козировская, А. І. Туряниця, В. А. Кордюм

INTERRELATIONS OF THE *KLEBSIELLA* GENERA WITH THE PLANT.

2. LOCALIZATION OF *K. OXYTOCA* AND *K. TERRIGENA* INTO THE TOBACCO AND WHEAT TISSUES

Summary

Bacteria *K. oxytoca* 13183, VN13, M5a1-47, *K. terrigena* 80-07, tagged with the bioluminescence genes (*lux*) of *Photobacterium leiognathi*, are able to be localized inside tissue of tobacco and wheat in both leaves and roots. There were revealed 10 fold less bacteria isolated from inner tissues as compared to bacteria isolated from the plant surface. The loss of the *lux* genes in bacteria developing in the plant tissue less 1% that is considerably lower than in bacteria growing in the continuous culture. Location of *K. oxytoca* VN13 and *K. terrigena* 80-07 inside the wheat roots has been proved by electron microscopy analysis. The artificial association of *Nicotiana tabacum* — *K. oxytoca* VN13 preserved the associative interactions under transition of bacteria in a cycle leaf — seedling → leaf — seedling.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brill W. J. Biochemical genetics of nitrogen fixation // *Microbiol. Rev.*—1980.—44.—Р. 449—467.
2. Козыровская Н. А., Махитрук В. Л., Рукдашел Э. Азотфиксирующие виды *Klebsiella* выделяют индолил-3-уксусную кислоту // *Биополимеры и клетка.*—1991.—6, № 5.—С. 89—91.
3. Нгуен Т. Х., Тон Т. Б., Тарасенко В. А., Козыровская Н. А. Азотфиксирующие бактерии колонизируют ксилему корня риса // Там же.—1989.—5, № 2.—С. 97—99.
4. Kozdrovska N., Alexeyev M., Kovtunovich G. et al. Survival of *Klebsiella oxytoca* VN13 engineered to bioluminescence on barley roots during plant vegetation // *Microbial Release.*—1994.—2.—Р. 261—265.
5. Алексеев М. Ф., Гуньковская Н. В. Метод быстрой трансформации энтеробактерий и некоторые факторы, влияющие на его эффективность // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 1.—Р. 47—51.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays for tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.*—1962.—15, N 3.—Р. 473—479
7. Kao K. N., Michayluk M. R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts // *Planta.*—1974.—115, N 4.—Р. 355—367.
8. Белявская Н. А., Козыровская Н. А., Кучеренко Л. А. и др. Взаимодействие бактерий рода *Klebsiella* с растением. I. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия эндофитных микроорганизмов с корнями проростков риса // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 1.—С. 55—60.
9. Петак А. М., Туряница А. И., Козыровская Н. А. Изучение влияния бактерий рода *Klebsiella* на регенерационные процессы // *Физиология и биохимия культурных растений.*—1995.—№ 5.—С.
10. Reingold B., Hurek T., Fendrik J. Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of Kallar grass // *Appl. Environ. Microbiol.*—1987.—53, N 4.—Р. 889—891.
11. Dobreiner J., Reis V. M., Lazarin A. C. New N₂-fixing bacteria in association with cereals and sugar cane // *Nitrogen fixation: hundred years after* / Eds H. Bothe, F. J. De Bruijn, W. E. Newton. — Stuttgart: Gustav Fisher, 1988.—Р. 717—722.
12. Dobreiner J., Reis V. M., Paula M. A., Olivares F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants // *New horizons in nitrogen fixation* / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton. — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1993.—Р. 671—676.
13. You C., Zhou F. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice // *Can. J. Microbiol.*—1989.—35, N 7.—Р. 403—408.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Поступила в редакцию
15.06.95