

О. В. Мошинець, С. П. Шпильова, Е. Д. Спайрс,
І. В. Косаківська

Фітосфера *Brasica napus* L. як екологічна ніша для *Pseudomonas fluorescens* SBW25

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. А. Кордюмом)

Досліджено характер зв'язку між ризо-, філо- та ендосферами, як компонентами фітосфери рапсу *Brasica napus* L., за допомогою модельної бактерії *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Були застосовані методи сканувальної конфокальної та електронної мікроскопії та метод квазісубстрату. Вивлено відмінності у динаміці та просторовій архітектурі колонізації ризоплану в стерильних та нестерильних умовах. Вперше, завдяки використанню нового методичного підходу "квазісубстрат," встановлено, що *P. fluorescens* SBW25 проявляє високу конкурентну здатність при колонізації ризоплану та ближніх ділянок ризосфери. Показано, що в стерильних умовах *P. fluorescens* SBW25, які перебувають у епіфітній і ендofітній зонах, не пригнічують ріст та розвиток рапсу. Процеси колонізації псевдомонадами ризосфери та ендосфери взаємопов'язані, а фітосфера *B. napus* L. розглядається як екологічна ніша для *P. fluorescens*. Дослідження характеру процесів колонізації поглиблює знання, важливі для розуміння біології взаємодії рослин та мікроорганізмів.

Співіснування рослин та мікроорганізмів відбувається впродовж усього життєвого циклу в трьох взаємопов'язаних просторах, а саме: надземній поверхні — фітосфері, тканинах рослини — ендосфері, та ризосфері — зоні субстрату, що безпосередньо прилягає до поверхні коренів та на яку діють кореневі екsudати. Рослинно-мікробні взаємовідносини розділяють на нейтральні, шкідливі та такі, що сприяють розвитку рослини [1]. З моменту формулювання Л. Хілтнером у 1904 р. поняття ризосфери [2] багатьма дослідженнями було доведено, що фітосфера, або сукупність усіх екологічних ніш, на які впливає рослина, є унікальним за своїм різноманіттям, щільністю та фізіологічною активністю мікробних популяцій утворенням [1]. Найбільш дослідженим компонентом фітосфери є ризосфера [3].

Бактерії, які колонізують ризоплан (поверхню коренів) та ризосферу і характеризуються корисними для рослин властивостями, визначають як групу PGPR (від англ. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, тобто ризобактерії, що стимулюють ріст рослин) [4, 5]. Вважають, що, представники групи PGPR є потенційними ендofітами, здатними подолати ендодермальний бар'єр. Вони потрапляють у рослину переважно через кореневий кортекс, інфікують судинну систему та утворюють ендofітні популяції в корені, стеблах, листках та інших органах [6]. До цієї групи належать бактерії роду *Pseudomonas*. Вони є типовими колонізаторами ризосферної зони, а окремі штами псевдомонад розглядаються як перспективні фітопротектори [7]. Встановлено, що псевдомонади колонізують ендосферу моркви та картоплі [8, 9].

Наша мета — дослідити взаємозв'язок між компонентами фітосфери, динаміку та просторову архітектуру колонізації псевдомонадами ризосфери, філосфери та ендосфери рапсу в стерильних та нестерильних умовах. Ми розглядаємо фітосферу *Brasica napus* L. як екологічну нішу для *Pseudomonas fluorescens* SBW25 та вважаємо, що процеси колонізації псевдомонадами ризосфери та ендосфери взаємопов'язані. Беручи до уваги те, що рапс *Brasica napus* L. — важлива технічна агрокультура в Україні, підвищення стійкості цих рослин до дії несприятливих біотичних чинників є актуальним завданням.

Динаміка та просторова архітектура колонізації фітосфери рапсу *B. napus* L. штамом SBW25 вивчалась нами із застосуванням методів сканувальної конфокальної та електронної мікроскопії та методичного підходу “квазісубстрат” (МПК) [10]. Використання хімічно та біологічно інертного носія МПК, поверхня якого набуває властивостей мікроеконіші, в якій він перебуває, забезпечила можливість дослідити мікроценоз *in situ*.

У першій серії експериментів рослини культивували в стерильній камері на стерильному цеоліті при відносній вологості 100%. Штам SBW25 маркували зеленим люмінесцентним білком за методом [11]. Насіння рапсу стерилізували в суміші 6%-го пероксиду водню та 70%-го етилового спирту (1 : 3), після чого проводили інокуляцію суспензією нічної культури бактерій та вносили до цеоліту. У результаті встановлено, що через три доби, тобто на першому етапі колонізації ризосфери, відбулося прикріплення окремих бактеріальних клітин до поверхні кореня та утворення волоконоподібних колоній (рис. 1, а). На сьому добу культивування спостерігалася колонізація усієї поверхні окремих ризодермальних клітин з утворенням бактеріальної біоплівки (див. рис. 1, б). Подібні результати, також на стерильному субстраті, були отримані при дослідженні колонізації ризоплану винограду бактерією *Burkholderia phytofirmans* [5]. Вірогідно, що швидкій та ефективній колонізації ризосфери рапсу сприяли здатність псевдомонад до розмноження в спермосфері — мікробіологічно динамічному регіоні ґрунту, що оточує проростаюче насіння [4], та відсутність у стерильній камері бактерій-конкурентів.

У другій серії експериментів досліджували колонізацію ризосфери рапсу штамом SBW25 в умовах нестерильного ґрунту (МПК), для якого характерно значне різноманіття автохтонної ризосферної мікрофлори (див. рис. 1, в). Встановлено, що штам SBW25 активно колонізує переважно зону ризоплану, утворюючи велику кількість мікроколоній, а в окремих випадках біоплівку (див. рис. 1, г). У ризосферній зоні клітини SBW25 виявлені в меншій кількості та переважно на ділянках поблизу кореня.

Як відзначалося вище, ризо-, ендо- та філосфери перебувають у постійному взаємозв'язку та взаємодії в рамках єдиного простору — фітосфери. Це спонукало нас дослідити, чи присутні бактерії SBW25 у філосфері та ендосфері рапсу в стерильних та нестерильних умовах. У стерильних умовах при 100% вологості атмосфери спостерігалася значна колонізація поверхні листків бактеріями, які не пригнічували ріст та розвиток рослини. Така колонізація носила дисперсний характер, між окремими зонами листка не виявлено істотних відмінностей (рис. 2, а, б). У нестерильних умовах колонізація філосфери була набагато меншою та відзначалася великим скупченням бактерій у зоні продихів та вздовж прожилок листка. Ми вважаємо, що це явище обумовлено низькою відносною вологістю повітря (близько 30%), яка не сприяє колонізації листової поверхні та провокує утворення епіфітних агрегатів бактерій за участю екзополісахаридів саме в зонах прожилок [11]. Крім цього, скупчення бактерій біля продихів забезпечує їх вологою,

яка виділяється під час транспірації. Присутність ризосферних конкурентів, які змагаються з клітинами SBW25 за колонізацію фітосфери рапсу, також може істотно знижувати кількість модельних псевдомонад у ендо- та філосферах у нестерильних умовах. Саме цим можна пояснити формування мікроколоній псевдомонад у міжклітинниках паренхіми листків у стерильних умовах, тоді як у нестерильних умовах такі колонії відсутні (рис. 3).

Таким чином, досліджено взаємозв'язок між компонентами фітосфери, проаналізовано та виявлено відмінності в динаміці та просторовій архітектурі колонізації псевдомонадами ризосфери, філосфери та ендосфери рапсу в стерильних та нестерильних умовах. Вперше, завдяки використанню нового МПК, встановлено, що *P. fluorescens* SBW25 проявляє високу конкурентну здатність при колонізації ризоплану та ближніх ділянок ризосфери. Виявлено, що в стерильних умовах *P. fluorescens* SBW25, які перебувають у епіфітній і ендофітній зонах, не пригнічують ріст та розвиток рапсу. Процеси колонізації псевдомонадами ризосфери та ендосфери взаємопов'язані, а фітосфера *B. napus* L. розглядається як екологічна ніша для *P. fluorescens* SBW25.

1. Montesinos E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology // Int. Microbiol. – 2003. – 6. – P. 221–223.
2. Hiltner L. Über neuerer Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbacteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache // Arb. Dtsch. Landwirtsch. – 1904. – 98. – P. 59–78.
3. Rovira A. D., Davey C. B. Biology of the rhizosphere // The Plant Root and its Environment / Ed. E. W. Carson. – Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. – P. 158–213.
4. Kloepper J. W., Schroth M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes // Proc. of the 4th Intern. Conf. on Plant Pathogenic Bacter., Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA. – Angers, France, 1978. – Vol. 2. – P. 879–882.
5. Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role in colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // Soil Biol. and Biochem. – 2009. – 41. – P. 1301–1310.
6. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2006. – 19. – P. 827–837.
7. Боронін А. М. Ризосферні бактерії роду *Pseudomonas* // Соросов. образоват. журн. – 1998. – 10. – С. 25–32.
8. Gyamfy S., Pfeifer U., Stierschneider M., Sessitsch A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere // FEMS Microbiol. Ecol. – 2002. – 41. – P. 181–190.
9. Surette M. A., Sturz A. V., Lada R. R., Nowak J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth // Plant Soil. – 2003. – 253. – P. 381–390.
10. Кордом В., Мошинець О., Цапенко М. та ін. Архітектура мікроценозів – світ невідомого // Вісн. НАН України. – 2008. – 3. – С. 23–36.
11. Lambertsen L., Sternberg C., Molin S. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins // Environ. Microbiol. – 2004. – 6(7). – P. 726–732.
12. Lindow S. E., Brandl M. T. Microbiology of the phyllosphere // AEM. – 2008. – 96, No 4. – P. 1875–1883.

The phytosphere of *Brassica napus* L. as a niche for *Pseudomonas fluorescens* SBW25

A link between rhizo-, phyllo-, and endospheres, the different components of the phytosphere of Brassica napus L. (rapeseed), has been studied with the model bacterium Pseudomonas fluorescens SBW25, under both sterile and non-sterile soil conditions, using both direct CLSM of plant tissues and the quasisubstratum approach. This methodology has provided us with a way to study the dynamics and the spatial architecture of the colonization of the rapeseed rhizoplane for the first time. It has been observed that P. fluorescens SBW25 showed a high competitiveness when colonizing the rhizoplane of the plant and the near-root part of the rhizosphere. It was shown that P. fluorescens SBW25 is able to colonize both the phyllo- and endospheres of rapeseed plants without damaging a plant organism. The analysis of the colonization process provides the basis for a more in-depth analysis of the interaction between microbes and plants in the future.