

А. П. Петросян, Е. Н. Аввакумова

Обмен веществ клубеньковых бактерий в клубеньках

(цитологические и цитохимические исследования)

Для выяснения связи между азотфиксирующей способностью клубеньковых бактерий и фазами развития растений необходимо изучить биохимический состав сока бобовых растений и клубеньков, и цитологические, цитохимические изменения, происходящие у клубеньковых бактерий в клубеньках по фазам развития растений.

Изучение цитологии и цитохимии клубеньковых бактерий представляет особый интерес и в том отношении, что по этому вопросу имеется мало исследований.

В настоящем сообщении будут изложены предварительные результаты наблюдений за цитологическими изменениями клубеньковых бактерий в клубеньках.

Морфологические и цитологические особенности клубеньковых бактерий изучались в клубеньках бобового растения по фазам его развития. Для наблюдения были взяты клубеньки люцерны и фасоли, а также попутно исследовались клубеньки эспарцета и донника.

Цитологические исследования проводились по выявлению: ядерных элементов (окраска по методу Романовского-Гимза и по Фельгену), волютина (по Мейеру), гликогена, липопротеиновых телец (по Имшенецкому) и оболочки (по Гутштейну).

Отмечалось также наличие и форма «нормальных» и бактериоидных клеток клубеньковых бактерий. Клубеньки для анализа брались через каждые 10 дней и делались отпечатки со срезов клубеньков, с верхней части клубенька, средней (самой активной) и нижней (с основания).

Клубеньковые бактерии люцерны первого года жизни в клубеньке не одинаковые в различных частях его (рис. 1, 2, 3).

Верхушка клубенька содержит, в основном, мелкие делящиеся, палочковидные клетки и в небольшом количестве бактериоидные, число которых возрастает к периоду цветения и созревания.

В активной (средней части клубенька) крупные палочковидные и разветвленные формы клубеньковых бактерий наблюдались уже в возрасте растения с четырьмя настоящими листьями и наибольшее количество бактериоидных клеток было в фазе бутонизации и цветения, в это время мелких клеток в клубеньке почти нет.

В основании клубенька на ранних стадиях развития растений бактериальные клетки такие же, как и в середине клубенька, иногда несколько более раздутые, а с периода цветения клетки бактерий начинают разрушаться и теряют внутреннее содержимое.

Формы развития клубенька	Возрастные периоды (по Ротенберг)		
	Верхняя часть клубенька	Средняя часть клубенька	Основание клубенька
13/1 4 настоящих листа			
25/1			
2/II			
12/II			
23/II начало цветения			
3/III цветение			
14/III созревание			

Рис. 1. Цитологические изменения клубеньковых бактерий в клубеньке люцерны 1-го года жизни за вегетацию.

Интенсивность окраски клубеньковых бактерий в клубеньках падает от верхушки к основанию, так как в основании клубенька бактериальные клетки более старые. Подобная картина наблюдается и у клубеньковых бактерий в клубеньках фасоли.

Цитологические изменения клубеньковых бактерий в клубеньке люцерны за вегетационный период приводятся на рис. 1, 2 и 3.

Из анализа бактериоидных и „нормальных“ клеток видно, что по внутриклеточному строению они мало отличаются друг от друга (рис. 1, 2, 3), но надо заметить, что чем крупнее

клетка, тем больше в ней клеточных включений. И „нормальные“ и бактериоидные клетки содержали в себе липопротеиновые тельца, волютин и ядерные элементы, но если

в нормальных клетках гранул нуклеоидов было (рис. 1) 2—3 в клетке (в основном 2), то в бактериоидах наблюдалось по 3—4 и даже до 6 гранул и очень редко по одному ядерному элементу.

Содержание клубеньков в клетке	ЛИПОПРОТЕИНЫ (по Интенсивности)		
	ВЕРХНЯЯ ЧАСТЬ КЛУБЕНЬКА	СЕРЕДИНА КЛУБЕНЬКА	НИЖНЯЯ ЧАСТЬ КЛУБЕНЬКА
19/II			
25/II			
2/III			
18/III			
22/III			
начало бутон			
3/IV			
цветет			
24/IV			
зрелая			

Рис. 2.

Формы развития клубеньков	ГЛИКОГЕН		
	ВЕРХНЯЯ ЧАСТЬ КЛУБЕНЬКА	СЕРЕДИНА КЛУБЕНЬКА	НИЖНЯЯ ЧАСТЬ КЛУБЕНЬКА
19/II			
25/II			
2/III			
18/III			
22/III			
начало бутон			
3/IV			
цветет			
24/IV			
зрелая			

Рис. 3.

Цитологические изменения клубеньковых бактерий в клубеньке люцерны 1-го года жизни за вегетацию.

То же самое можно сказать и в отношении волютина, а также липопротеидов (рис. 2.) и гликогена (рис. 3). Последний присутствует в клетках бактерий не во все периоды развития растения-хозяина. Иногда наблюдаются различия в интенсивности окраски—бактериоидные клетки окрашиваются несколько слабее, чем нормальные.

Изменения цитологии клубеньковых бактерий за вегетационный период происходят одинаково в «нормальных» и бактериоидных клетках.

Так, количество (относительное) липопротеидов (рис. 2) снижается к концу вегетации, к периоду цветения и созревания (с 2—5 гранул до 2—3 в клетке), причем с момента цветения липопротеиновые тельца обнаруживаются уже не во всех клетках.

Напротив, количество волютина постепенно возрастает, и наибольшее его количество наблюдается в период бутонизации и цветения.

Интересно накопление гликогена в клетках бактерий (рис. 3). К концу вегетации количество его возрастает, но в период наибольшей активности клубеньковых бактерий, в фазы бутонизации и цветения—гликоген из клеток исчезает. В это же время наблюдается и наименьшее количество крахмальных зерен в растительных клетках клубенька. Барджерсен (1955) объясняет избыток накопления углеводов, в том числе и гликогена, у растений недостатком азотного питания, он наблюдал также накопление гликогена у неактивных штаммов клубеньковых бактерий. Нуклеоиды (рис. 1) были обнаружены в бактериях во все фазы развития растения, только к концу вегетации они слабее окрашивались и имели неясные очертания гранул, а в основании клубенька зерна нуклеоидов наблюдались вне клетки.

Данные анализа 1961 года почти совпадают с данными 1960 года, по которым также не найдено большого различия между нормальными и бактериоидными клетками по внутриклеточному строению.

Кроме люцерны, анализировались также клубеньковые бактерии из клубеньков фасоли.

У фасоли различия между клубеньковыми бактериями в разных частях клубенька (рис. 4, 5, 6) меньше заметны, чем у люцерны. Тем не менее, наибольшее количество бактериоидных клеток обнаруживается в центральной части клубенька, на периферии—больше мелких делящихся клеток (бактероиды у фасоли в виде крупных палочек). Количество бактериоидов возрастает к периоду цветения и уже в фазу цветения начинается разрастание клеток и их разрушение.

Так же, как и у люцерны, у клубеньковых бактерий фасоли не было найдено больших различий в цитологическом строении между «нормальными» клетками и бактериоидными, кроме тех, что бактериоидные клетки содержали несколько больше гранул липопротеиновых телец, волютина и нуклеоидов и иногда хуже окрашивались (рис. 4, 5, 6). Ядерные элементы (рис. 4) в бактериальных клетках фасоли наблюда-

лись в виде гранул с расплывчатыми краями от 2 (в нормальных клетках) до 6 (в бактериоидных) во все фазы развития растения. Иногда все клетки были равномерно окрашены (очевидно ядерное вещество в таких клетках распределено диффузно по всей клетке). Таких клеток встречается мало.

Изменения внутриклеточного строения бактерий фасоли в зависимости от фазы развития растения-хозяина подобны изменениям у люцерны: уменьшается количество липопротеидов к периоду цветения и снова возрастает в период созревания семян. Наибольшее количество волютина (рис. 5) наблюдалось во время цветения растения. Гликоген (рис. 6) накапливался к концу вегетации, но даже в период созревания он был обнаружен не во всех клетках, гликоген содержали приблизительно 30% клеток.

Подвергались цитологическому анализу и клубеньковые бактерии эспарцета и донника. Результаты наблюдений сходны с результатами исследования клубеньковых бактерий люцерны.

Для сравнения проводился цитологический анализ чистой культуры клубеньковых бактерий на бобовом агаре, выделенных из клубеньков исследуемых растений.

В чистой культуре бактериоиды отличаются от нормальных клеток наличием большего количества липопротеидов, волютина и ядерных элементов. Гликоген в бактериальных клетках в чистой культуре совсем не обнаружен. Чем старше культура, тем больше в ней появляется бактериоидов и тем хуже она окрашивается.

Фазы развития растения	Ядерные элементы		Изменения клубенька
	ВЕРХНЯЯ часть клубенька	СЕРЕДНЯЯ часть клубенька	
15/VI 2-й этап цветы			
22/VI			
3/VII начало созревания семян			
4/VII начало созревания семян			
24/VII позднее созревание семян			
31/VII созревание семян			

Рис. 4. Цитологические изменения клубеньковых бактерий в клубеньке фасоли за вегетацию.

Итак, можно резюмировать, что и «нормальные» палочковидные и бактериоидные клетки имеют одинаковые клеточные включения. Содержат ядерные элементы в виде гранул, от 1 до 6 в клетке. В мелких клетках 1—2, чаще 1, в крупных (бактериоидах) от 1 до 6, чаще 3—4 гранулы. Окраска по Романовскому-Гимза и реакция Фельгена дают возможность предполагать, что наблюдаемые гранулы являются нуклеоидами, так как при гидролизе в горячем растворе 1/н HCl препаратов растворяются метакроматические зерна (волютин). К тому же реакция Фельгена—почти единственный индикатор на тимонуклеиновую кислоту.

Фазы развития растения	ВОЛЮТИН (по Мейеру)		
	БЕЗЪЯДЕР- НЫЕ КЛУБЕНЬКИ	СРЕДНИЕ КЛУБЕНЬКИ	ОСНОВНЫЕ КЛУБЕНЬКИ
15/VI 2-й лист			
22/VI			
3/VI начало бутониз.			
12/VI начало цветения			
24/VI пик цветения			
6/VI созревание			

Рис. 5.

Цитологические изменения клубеньковых бактерий в клубеньке фасоли за вегетацию.

Фазы развития растения	ГЛИКОГЕН		
	БЕЗЪЯДЕР- НЫЕ КЛУБЕНЬКИ	СРЕДНИЕ КЛУБЕНЬКИ	ОСНОВНЫЕ КЛУБЕНЬКИ
15/VI 2-й лист			
22/VI			
3/VI начало бутониз.			
12/VI начало цветения			
24/VI пик цветения			
6/VI созревание			

Рис. 6.

Существование гранул или диффузных зон, дающих положительную реакцию Фельгена, отмечено многими исследователями. Миловидов (Milovidov, 1935), Шаде (Schade, 1941) констатировали диффузную окраску по Фельгену у клубеньковых бактерий. Чижик (1959) говорит о ядерном веществе клубеньковых бактерий, находящемся в диффузном состоянии, и об отмирании нуклеоидов в виде гранул у бактериоидных клеток при воздействии на них неблагоприятных факторов (температуры, ультрафиолетовых лучей).

Байлор, Апплеман, Сёрс, Кларк (Baylor, Appleman, Sears, Clark, 1945) описывают нуклеарные гранулы, видимые в электронный микроскоп у клубеньковых бактерий в культуре и у выделенных из клубеньков. Подобные наблюдения имеются у Бизета (Bisset, 1952), Ухера (Uher, 1937), Воетса (Voets, 1949), которые также нашли хорошо дифференцированные ядра у *Rhizobium*. Воетс, применяя метод Гимза и Робиноу, показал, что перед делением материнской клетки появляется четыре ядра и после деления каждая дочерняя клетка имеет два ядра. Берджерсен (Bergersen, 1955) дает и детальное строение ядра у бактериоидов активных и неактивных клубеньков, считая разъединенность ядерного вещества признаком дегенерации клетки.

В наших наблюдениях подавляющее большинство клеток клубеньковых бактерий (и нормальных, и бактериоидных) содержали нуклеоиды в виде гранул (2—6 в клетке), что дает возможность предположить способность к делению и у бактериоидных клеток, или, по крайней мере, считать их жизнеспособными формами, участвующими в фиксации атмосферного азота.

О том, что бактериоидные клетки нежизнеспособны и образуются при воздействии неблагоприятных факторов, говорится во многих работах Красильникова, (1949), Наундорфа и Нильсона (Naundorf, Nilson, 1943) и др. Алмон (Almon, 1933) изолировал бактериоидные клетки (411 клеток) из клубеньков и ни одна из них не дала роста на искусственной среде.

В то же время, факт наличия в клубеньках большого количества бактериоидов, особенно в период бутонизации и цветения, в период, когда фиксируется наибольшее количество азота и наблюдается наибольшая активность клубеньковых бактерий, выделенных именно в эти фазы (Федоров, Главачкова, 1956; Нице Лазэр, 1957; Ласло—Laszlo, 1957; Петросян, 1957, 1959), говорит о том, что бактериоиды должны принимать активное участие в симбиозе с бобовыми в фиксации атмосферного азота. Сок бобовых, особенно в фазы бутонизации и цветения, также стимулирует рост клубеньковых

бактерий, а не подавляет их (Петросян, 1957, 1959). Поэтому вещества, выделяемые растением, хотя и могут влиять на образование бактериоидных клеток, но это влияние не обязательно должно быть отрицательным для симбиоза, как отмечено в работе Чижика.

Накопление в клетках бактерий (и «нормальных» и бактериоидных) гликогена к концу вегетации растения, когда фиксация азота уменьшается, и отсутствие гликогена (у люцерны) в период наибольшей интенсивности фиксации (бутонизация и цветение) дают возможность предположить, что накопление гликогена в бактериальных клетках как-то связано с активностью клубеньков. Подобные наблюдения имеются в работе Берджерсена (1955). Им описано накопление гликогена в бактериоидах неактивных клубеньков и отсутствие его у активных.

Полученные предварительные данные позволяют сделать некоторые, возможно тоже предварительные, выводы.

1. Наблюдаются некоторые различия в цитологическом строении бактериальных клеток в разных частях клубенька (верхняя, средняя, самая активная, и основание).

2. Бактероидные клетки в клубеньках бобового растения мало отличаются от «нормальных» по своему цитологическому строению.

3. Бактероидные клетки, так же как и «нормальные», изменяются по своему внутриклеточному строению в разные фазы развития растения.

Ա. Պ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ե. Ն. ԱՎԱԿՈՄՈՎԱ

ՊԱՆԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՊԱՆԱՐԻԿՆԵՐՈՒՄ (ԲՋՋԱԲԱՆԱԿԱՆ ԵՎ ԲՋՋԱՔԻՄԻԱԿԱՆ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ)

Ա Մ Փ Ն Փ Ն Ն Մ

Մթնոլորտի գազանման ազոտի բիոլոգիական յուրացման երե-
վույթը երկար տարիների բազմաթիվ ուսումնասիրությունների ա-

ռարկա է եղել և այժմ էլ նույն հետաքրքրությամբ ուսումնասիրվում է այդ շահազանց կարևոր ու հետաքրքրական պրոբլեմին վերաբերվող տարբեր հարցերը:

Պարզելու համար՝ պալարաբակտերիաների ակտիվության և թիթեռնածաղկավոր բույսերի զարգացման փուլերի մեջ եղած կապը, գտանք. անհրաժեշտ աշխատանքների տվյալ էտապում ուսումնասիրել թիթեռնածաղկավոր բույսերի, նրանց բուսահյուսի և պալարիկների բիոքիմիական կազմի փոփոխությունը բույսերի վեգետացիայի ընթացքում: Բացի այդ, զուգահեռ ուսումնասիրել նաև պալարաբակտերիաների բջջաբանական և բջջաքիմիական փոփոխությունները պալարիկներում, ըստ բույսերի զարգացման փուլերի:

Այս հաղորդման մեջ բերված են միայն նախնական տվյալներ պալարաբակտերիաների բջջաբանական փոփոխությունների վերաբերյալ, լոբու և առվույտի պալարիկներում: Հայտնաբերված են բակտերիալ բջիջների կորիզային՝ նուկլեինային, նյութերը, վոլյուտին, գլիկոգեն, ճարպապեպտոնային մարմնիկներ, բջջաթաղանթ:

Ստացված տվյալներով պարզվում է, որ՝

1. Պալարիկների տարբեր մասերի (վերևի, միջին ամենաակտիվ և հիմքի) պալարաբակտերիաների բջիջների ներքին կառուցվածքում կա որոշ տարբերություն:

2. Թիթեռնածաղկավոր բույսերի պալարիկներում, պալարաբակտերիաների ձողիկների (սնորմալ) և բակտերիոիդ ձևերի բջջաբանական կառուցվածքում առանձին տարբերություն չի նկատվել:

3. Թիթեռնածաղկավոր բույսերի զարգացման տարբեր փուլերում փոփոխվում է պալարաբակտերիաների թե սնորմալ և թե բակտերիոիդ ձևերի ներքին կառուցվածքը:

A. P. Petrosian, E. N. Avvakumova

Metabolism of nodule bacteria (Cytological and cytochemical studies)

Summary

1. There is a certain difference between the internal construction of the cells of the nodule bacteria in various parts of the nodules (upper, the most active middle and the bottom).

2. No particular difference has been noticed between nodule bacteria rods „normal“ in the nodules of leguminous plants and in the constructions of bacterioid forms.

3. In certain stages of development of leguminous plants the internal construction of the „normal“ and bacterioid forms of the nodule bacteria changes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. Изд. АН СССР, 1949.
2. Нице Лазер. Доклады Московской с.-х. акад. им. Тимирязева, 1957, в. 29.
3. Петросян А. П. «Изв. АН АрмССР», серия биол. наук, 1957, т. X, № 4.
4. Петросян А. П. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР, Ереван, Сельхозгиз, 1959.
5. Федоров М. В., Главачкова Е. В. «Изв. Московской с.-х. акад. им. Тимирязева», 1956, № 1.
6. Чижик Г. Я. «Микробиология», 1959, т. XXVIII, в. 1.
7. Almon L. Zentralblatt fur Bact. etc II; Abt. 1933, Bd. 87, № 13—16.
8. Baylor M. B., Appleman M. D., Sears O. N., Clark G. L. J. Bact., 1945, 50.
9. Bergersen F. J. Can. Microbiol. 1955, B, № 3.
10. Bisset K. A. J. gen. Microbiol., 1952, 7.
11. Laszlo G., Agrokem. es Talay, 1957 6, № 2.
12. Milovidov P. F., Arch. Microbiol., 1935, 6.
13. Naundorf G., Nilsson R., Naturwissenschaften, 1943, 31.
14. Uher M., Sbornik Ceskoslv. Akad. Zemedelske, 1937, 12.
15. Voets J. Mededel landbouwhoy en Opzoekingsstas, 1949, 14.