УДК 577.158.16 : 576.3

Е. Н. Аввакумова, М. Г. Шамцян, В. С. Пилосян, М. В. Овсепян

Цитохимические исследования клубеньковых бактерий в связи с эффективностью симбиотической азотфиксации

Интенсивность симбиотической азотфиксации зависит как от растения-хозяина, так и от клубеньковых бактерий в клубеньке. Изучение клубеньковых бактерий в клубеньках могло бы быть использовано для выявления различий между эффективным и неэффективным симбиозом.

Попытки найти различия между клубеньковыми бактериями в клубеньках при эффективном и неэффективном симбиозе по биохимическим показателям были сделаны многими исследователями: Leiderman J., 1967; Загорье, Макарова, 1969; Мелик-Саркисян, Карапетян, Кретович, 1969; Калмыков, Маркелова, 1969 и др. Результаты этих исследований имеют иногда противоречивый характер.

Рядом исследователей были найдены некоторые различия в строении клубеньковых бактерий в клубеньках при эффективном и неэффективном симбиозе (Bergersen, 1955; Golebiowska, Sipnewska, 1962; Dixon, 1967; Аввакумова, 1967; Аввакумова, Розанова, Шамцян, 1970 и др.).

Целью настоящей работы было найти цитологические и цитохимические различия между клубеньковыми бактериями в клубеньках при эффективном и неэффективном симбиозе.

Методика исследования

Для исследования клубеньковых бактерий в процессе симбиоза использовались клубеньки растений фасоли, гороха, кормовых бобов и сои, образованные активными и неактивными штаммами.

Для инокуляции бобовых растений были использованы местные штаммы клубеньковых бактерий гороха и фасоли. Клубеньковые бактерии сои получены из Всесоюзного научно-исследовательского Института сельскохозяйственной микробиологии (Ленинград), клубеньковые бактерии кормовых бобов выделены в Институте сельского хозяйства нечерноземной полосы.

Изучались также и малоактивные штаммы, однако в работе приведены результаты, касающиеся штаммов, резко различающихся по своей эффективности.

Эффективность штаммов изучалась в вегетационных и полевых опытах. Клубеньки для анализа отбирали от 3-х до 9 раз за вегетацию. Из срезов клубеньков делались отпечатки на предметном стекле. Препараты фиксировались, окрашивались с помощью различных цитологических и цитохимических методов и просматривались под световым микроскопом марки Nu Zeiss.

Выявление нуклеоидов проводилось с помощью окраски по Фельгену, по методу Робиноу (HCl-Гимза), клеточной стенки—по Гутштейну. Полисахариды выявлялись с помощью реакции Шифф-йодная кислота (ШИК). Для уточнения природы ШИК—положительных веществ проводили экстракцию липидов смесью метилового спирта, эфира и хлороформа.

Наличие мукополисахаридов определялось путем контрольной обработки препаратов лизоцимом и гиалуронидазой. Кислые мукополисахариды выявлялись также окраской альциановым синим по Стидману.

Гликоген определялся реакцией ШИК, окраской йодным раствором Люголя и кармином по Бесту, с контрольной обработкой препаратов амилазой или слюной, липиды—суданом черным по Мак-Манусу, белки—окраской прочным зеленым по Олферту с контрольной обработкой препаратов пепсином и трипсином, РНК—пиронином по Браше (контроль—обработка препаратов рибонуклеазой). Все перечисленные цитологические и цитохимические методы в основном воспроизведены по Пешкову (1955) и Пирсу (1962).

Результаты исследований

Как показали наши наблюдения, проводившиеся в течение 5 лет, эффективные штаммы клубеньковых бактерий повысили урожай бобовых растений на 23—60% по сравнению с контрольными вариантами. Растения, инокулированные неэффективными штаммами, имели урожай, близкий к урожаю контрольных растений (табл. 1).

При сравнении цитологических и цитохимических особенностей клубеньковых бактерий в клубеньках были выявлены некоторые различия между ними, в зависимости от эффективности симбиоза. Так, бактероидные формы в клубеньках были обнаружены, в основном, при инокуляции эффективными

Таблица 1

Влияние активных и неактивных штаммов клубеньковых бактерий на урожай бобовых культур (в % к контролю) (вегетационные и полевые опыты 1965—1970 гг.)*

№ штаммов клубеньковых бактерий	Урожай инокулированных растений	№ штаммов клубеньковых бактерий	Урожай инокулированных растений
Горох		Фасоль	
65 активный	125.4	100 активный	139.7
68 »	122.6	107 неактивный	102.8
123 »	126.9	109 неактивный	90.0
144 »	123.6	Соя	161.6
36 неактивный	100.8	647 активный	163.3
227а »	113.0	646 активный	68.3
Кормовые бобы		631 неактивный	120.0
31 активный	230.0	640 »	
97 неактивный	100.0		

* В полевых опытах изучались клубеньковые бактерии сои.

штаммами (рис. 1). Клубеньки, образованные неэффективными штаммами, содержали мелкие палочковидные клетки (рис. 2), а иногда и бактероидные клетки, которые имели раздутую уродливую форму (рис. 3).

Рис. 1. Бактероидные формы в эффективных клубеньках гороха, штамм 123. Фиксация жидкостью Буэна, окраска по Гутштейну. Ув. 2000 х.

При изучении нуклеоидов выяснилось, что по наличию нуклеоидов в клетках бактерий нет четких различий между эффективными и неэффективными штаммами клубеньковых бактерий (рис. 4, 5).

Рис. 2. Палочковидные клетки в неэффективных клубеньках гороха, штамм 36. Окраска по Гутштейну. Ув. 2000 х.

Рис. 3. Уродливые бактероидные клетки в неэффективных клубеньках гороха, штамм 36. Окраска по Гутштейну. Ув. 2000 х.

Наиболее заметные различия между активными и неактивными штаммами наблюдались по содержанию в клетках бактерий гликогена. Из данных табл. 2 видно, что в клетках бактерий эффективных клубеньков гликоген отсутствовал у всех изученных культур (горох, фасоль, кормовые бобы, соя). В очень незначительных количествах он был найден лишь в начале или в конце вегетации растений, причем не у всех штаммов. И, как правило, гликоген у эффективных штаммов совсем не был обнаружен в период бутонизации растения, в период наивысшей азотфиксирующей активности клубенько-

вых бактерий. Клетки бактерий неактивных штаммов содержали гликоген в виде мелких внутриклеточных гранул даже в период бутонизации растений (рис. 6).

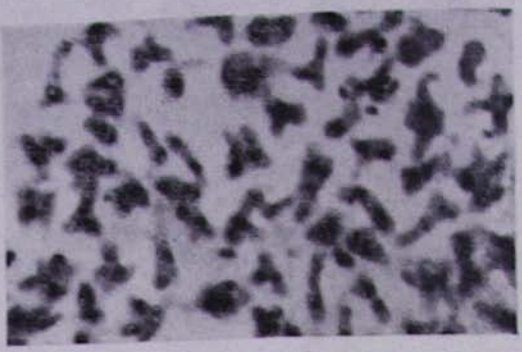

Рис. 4. Нуклеоиды у клубеньковых бактерий эффективных клубеньков гороха, штамм 144. Фиксация жидкостью Карнуа, окраска HCl-Гимза. Ув. 2000 х.

Рис. 5. Нуклеоиды у клубеньковых бактерий неэффективных клубеньков. Окраска HCl-Гимза. Ув. 2000х.

Наличие и локализация кислых и основных белков в клетках клубеньковых бактерий также неодинаковы у различных штаммов (табл. 3). Сравнивая эффективные и неэффективные штаммы клубеньковых бактерий гороха, фасоли, кор-

мовых бобов и сои по наличию в цитоплазме клеток кислых или основных белков, можно заметить общие для всех изученных культур закономерности. У бактероидов эффективных клубеньков цитоплазма давала положительную реакцию на белки, у неэффективных—отрицательную. Особенно заметно выражен этот признак в период бутонизации и цветения растения-хозяина. Наличие или отсутствие белков в клеточной оболочке и в нуклеоидах не коррелирует с эффективностью штаммов.

Рис. 6. Гликоген у клубеньковых бактерий неэффективных клубеньков, штамм 36. Фиксация формалином. Реакция Шифф-йодная кислота (ШИК). Ув. 2000 х.

Такая же закономерность, какая найдена для белков, отмечается и для рибонуклеиновой кислоты. РНК в цитоплазме бактероидов обнаруживается в большем количестве при эффективном симбиозе. Однако в этом случае связь между наличием РНК в цитоплазме и эффективностью симбиоза проявляется с меньшей четкостью, чем по белкам.

Эффективные и неэффективные штаммы отдельных бобовых культур отличались по окраске гиалуроновой кислоты в капсуле. Но эта разница между штаммами не всегда ярко выражена.

Совсем не найдено корреляции между эффективностью штаммов и наличием в клетках бактерий липидов. Однако отдельные штаммы различались между собой по содержанию липидов в клетках, но эти различия не были связаны с активностью штамма.

Таблица 2

Наличие гликогена в клетках бактерий клубеньков при эффективном и неэффективном симбиозе (опыты 1965—1970 гг.)

Фазы развития растений	Эффективные штаммы								Неэффективные штаммы						
	горох				кормовые бобы	фасоль	соя		горох		кормовые бобы	фасоль		соя	
	№65	№68	№123	№144	№31	№100	№646	№647	№36	№227а	№97	№107	№109	№631	№640
5—6 настоящих листьев	—	±	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+
Бутонизация	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
Цветение	—	—	—	—	±	—	—	—	±	±	+	+	+	—	—

Примечание: (+)—положительная реакция; (—)—отрицательная реакция; (±)—слабоположительная реакция.

Таблица 3

Наличие кислых белков в цитоплазме клубеньковых бактерий в клубеньках при эффективном и неэффективном симбиозе (опыты 1965—1970 гг.)

Фазы развития растений	Эффективные штаммы						Неэффективные штаммы				
	горох				кормовые бобы	фасоль	горох		кормовые бобы	фасоль	
	№ 65	№ 68	№ 123	№ 144	№ 31	№ 100	№ 36	№ 227а	№ 97	№ 107	№ 109
5—6 настоящих листьев	±	±	+	+	+	±	±	—	—	—	—
Бутонизация	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Цветение	±	±	±	+	—	+	—	—	—	—	—

Таким образом, изучение развития клубеньковых бактерий в клубеньках бобовых растений показало, что при эффективном и неэффективном симбиозе они развиваются неодинаково. В клубеньках, образованных активными штаммами клубеньковых бактерий, наблюдается большое количество бактероидных форм, в отличие от неактивных. Подобная зависимость отмечалась ранее многими исследователями (Корсакова, Лопатина, 1934; Virtanen, 1945; Heumann 1952; Петросян, 1959 и др.).

Накопление гликогена в бактериальных клетках неактивных клубеньков наблюдали многие исследователи. Бергерсеном и Диксоном (Bergersen, 1955; Dixon, 1967) гликоген найден в бактериальных клетках неэффективных клубеньков у клевера, а Голебовской и Сипневской (Golebiowska, Sipniewska, 1962) — у люпина. Однако эти авторы проводили исследования с небольшим набором штаммов клубеньковых бактерий.

О найденной нами корреляции между эффективностью симбиоза и накопленных в цитоплазме бактериальных клеток клубенька белков и РНК в литературе сообщений не было.

Обобщая результаты цитологических и цитохимических исследований, можно отметить некоторую связь между эффективностью симбиоза и состоянием клубеньковых бактерий в клубеньках растения-хозяина (гороха, фасоли, кормовых бобов, сои).

Выводы

1. Эффективные штаммы образовали в клубеньках большое количество бактероидных форм, неактивные — в основном мелкие палочковидные формы.

2. Для эффективных штаммов характерно отсутствие в клетках бактерий гликогена, особенно в период бутонизации растения-хозяина. У неэффективных штаммов гликоген в бактериальных клетках присутствовал почти в течение всей вегетации растения.

3. Эффективные штаммы отличались от неэффективных наличием в цитоплазме бактероидов кислых или основных белков и РНК. Этот признак ярче всего выражен также в период бутонизации—цветения растений.

4. Для симбиоза отдельных видов бобовых культур могут быть свои особенности и отклонения. Тем не менее, некоторые цитохимические признаки клубеньковых бактерий в клубеньках (наличие гликогена, белков и РНК в цитоплазме) могут служить косвенным показателем активности штамма и быть

использованными при отборе эффективных культур клубеньковых бактерий.

Ե. Ն. ԱՎԱԿՈՒՄՈՎԱ, Մ. Գ. ՇԱՄՑՅԱՆ, Վ. Ս. ՓԻԼՈՍՅԱՆ,
Մ. Վ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ

ՊԱԼԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲՋՋԱԲԱՆԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ՝ ԿԱՊՎԱԾ ՍԻՄԲԻՈՏԻԿ ԱԶՈՏՈՖԻՔՍԱՑԻԱՅԻ ԷՖԵԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏ

Ամփոփում

Կատարվել են պալարաբակտերիաների բջջաբանական և բջջաքիմիական ուսումնասիրություններ ոլոռի, լոբու, կերային բակլայի և սոյայի պալարիկներում արդյունավետ և ոչ արդյունավետ համակեցության պայմաններում։

Ուսումնասիրությունների շնորհիվ բացահայտվել են որոշ տարբերություններ ակտիվ և ոչ ակտիվ շտամներով վարակումից առաջացած պալարիկների մեջ գտնվող պալարաբակտերիաների միջև։ Ակտիվ շտամները պալարիկների մեջ առաջացրել են մեծ քանակով բակտերոիդ ձևեր, իսկ ոչ ակտիվները՝ հիմնականում մանր, ձողաձև բջիջներ։

Ակտիվ շտամներին բնորոշ է բակտերիաների բջիջներում գլիկոգենի բացակայությունը, թթու կամ հիմնային սպիտակուցների, ինչպես նաև բակտերոիդների, բջջապլազմայում ՌՆԹ-ի առկայությունը։

Ակտիվ և ոչ ակտիվ պալարաբակտերիաների միջև գտնված բջջաբանական տարբերությունները կարող են ծառայել որպես շտամների ակտիվության լրացուցիչ ցուցանիշ։

ЛИТЕРАТУРА

Аввакумова Е. Н. 1967. Сб. «Биологический азот и его роль в земледелии». М., «Наука».

Аввакумова Е. Н., Розанова Л. И., Шамцян М. Г. 1970. Биол. журнал Армении, 23,5.

Загорье И. В., Макарова В. И. 1969. Бюлл. ВНИИ с.-х. микробиол., 14,2.

Калмыков К. Ф., Маркелова В. Т. 1969. Сб. «Физиолог. и биохимич. сорта», ч. I, Иркутск.
Корсакова М. Н., Лопатина Г. В. 1934. Микробиология, 3,2.
Мелик-Саркисян С. С., Карапетян Н. В., Кретович В. Л. 1969. ДАН СССР, 4.
Петросян А. П. 1959. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР. Ереван, Сельхозгиз.
Пешков М. А. 1955. Цитология бактерий. М.—Л.
Пирс Э. 1962. Гистохимия, М.
Bergersen F. J. 1955. J. Gen. Microbiol., 13, 3.
Dixon R. O. D. 1967. Arch. Microbiol., 56, 2.
Golebiowska J., Sypniewska U. 1962. Acta microbiol. polon., II, 4.
Heumann W. 1952. Naturwissensch., 39, 3.
Leiderman J. 1969. Res. and. y. agr. Tucuman, 46, 1
Virtanen A. 1945. Nature, 155, 3947.