

Е.Н. Аввакумова, М. В. Овсебян,
В. С. Пилосян

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM С ИЗМЕНЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К РАСТЕНИЮ - ХОЗЯИНУ

В предыдущей работе были сообщены данные о получении с помощью полиплоидогенов крупноклеточных мутантных форм клубеньковых бактерий. Крупноклеточные формы отличались от исходных штаммов большим объемом клеток и нуклеридов и повышенным содержанием ДНК на клетку. Все эти признаки дают возможность отнести крупноклеточные мутанты к полиплоидным формам.

В литературе имеются сообщения о том, что у полиплоидных форм микроорганизмов, наряду с увеличением их размеров, наблюдаются изменения в цитологии клеток — утолщение клеточных стенок, увеличение митохондрий, повышение содержания гликогена, жира, метакроматина (Попова, 1966; Имшенецкий, Солнцева, 1974). Полиплоидные формы имеют более высокую ферментативную активность и способность синтезировать витамины по сравнению с гаплоидными (Имшенецкий, Кондратьева, 1968, 1977; Имшенецкий, Жильцова, 1972; Loskowski et al., 1960), отличаются большей частотой мутаций (Каменева, 1961; Имшенецкий, Кондратьева, 1976; Кондратьева, 1974 и др.) и большей устойчивостью к внешним факторам (Богданова, Рапопорт, 1977).

В связи с этим представляет интерес изучение цитолого-цитохимических особенностей полученных крупноклеточных мутантных форм клубеньковых бактерий в связи с их плоидностью.

Целью настоящей работы было выявление с помощью цитолого-цитохимических методов некоторых полисахаридов, липидов, белков и ферментов в клетках полиплоидных форм *Rhizobium leguminosarum*, изменивших специфичность к растению-хозяину.

Материал и методика исследований

Исследования проводились с исходным штаммом клубеньковых бактерий гороха №123 и его полиплоидными формами №№ 123аа⁴⁸, 123ак⁴⁹, 123ак³¹, 123к⁵⁰, изменившими видовую специфичность к растению-хозяину, и штаммом №123а⁶⁰ - не изменившим специфичность (индексы после номера полиплоидных штаммов обозначают: а - получение при совместном выращивании с азотобактером, к - с помощью колхицина, несколько индексов - при комбинированном воздействии).

Препараты культур клубеньковых бактерий готовились в возрасте 3 и 25 суток.

Методики определения полисахаридов, в том числе гликогена, липидов и кислых белков, приведены в ранее вышедшей работе (Аввакумова и др., 1973). Пероксидаза выявлялась с помощью бензидинового метода, по окрашиванию зон ферментативной активности и по количеству клеток, содержащих пероксидазу. Клетки подсчитывались под микроскопом, учитывалось не менее 2000 клеток - от 50 до 100 в каждом поле зрения.

Препараты просматривались под световым микроскопом марки NU - Zeiss.

Результаты исследований

Полученные полиплоидные формы клубеньковых бактерий гороха проявили новые симбиотические свойства. Некоторые из полиплоидных штаммов образовали клубеньки как на своем растении-хозяине горохе, так и на новом - людерне.

Изучение цитологических особенностей клубеньковых бактерий гороха выявило ряд различий между исходным штаммом и полиплоидными формами по наличию и распределению в клетках отдельных химических компонентов (табл. 1).

ШИК - положительные вещества полисахаридной природы были найдены в клеточной оболочке и в виде внутриклеточных гранул (рис. 1).



Рис. 1. Реакция ШИК на полисахариды клеток клубеньковых бактерий гороха; а) – исходный штамм №123; б) – полиплоидный штамм №123к₅₉. Увеличение в 3500 раз.

Обработка препаратов слюной с последующим проведением реакции ШИК и параллельное окрашивание йодным раствором Люголя дали возможность выявить в клетках бактерий гликоген. По содержанию гликогена в клетках исследуемые штаммы различались между собой (табл. 1). У полиплоидных штаммов с измененной специфичностью №№123аа₄₈, 123ак₃₁ и 123к₅₉, в отличие от исходного №123, гликоген в клетках трехсуточных культур не обнаружен. Остальные полиплоидные штаммы как с измененной, так и неизменной специфичностью, по содержанию гликогена в клетках не отличались от исходного. В 25-суточной культуре гликоген в незначительном количестве был найден только у полиплоида № 123аа₄₈.

Липиды (табл. 1) у клубеньковых бактерий гороха обнаружены в виде внутриклеточных включений и в клеточной оболочке (рис. 2). Отдельные полиплоиды отличались от исходного штамма отсутствием липидов в 3-суточной культуре (№№ 123аа₄₈, 123ак₃₁). У штамма 123ак₃₁ липиды найдены в клеточной оболочке. В старой, 25-суточной культуре внутриклеточные липиды отсутствовали лишь у полиплоидного штамма №123ак₉₄₉, а в клеточной оболочке – выявлены у полиплоидов №№123ак₃₁ и 123к₅₉. Остальные штаммы, с измененной и неизменной специфичностью, не отличались от исходного №123.

Наиболее заметные различия между штаммами были выявлены по наличию и локализации в клетках кислых белков (табл. 1).

Таблица 1

Цитохимические особенности полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха

Изученные признаки	Штаммы					
	исходный		полиплоидные			
	123	123a ₆₀	123aa ₄₈	123ак _{9a49}	123ак ₃₁	123к ₅₉
Количество ДНК (мкг/млрд. клеток)	3,6	6,5	8,5	15,9	7,4	5,5
Специфичность к растению-хозяину	горох	горох	горох люцерна	горох люцерна	горох люцерна	горох люцерна
	3-суточная культура					
Гликоген	+	+	-	+	-	-
Липиды внутриклеточные	+	+	-	-	-	+
Липиды клеточной оболочки	-	-	-	-	+	-
Кислые белки цитоплазмы	+	-	+	-	+	+
Кислые белки клеточной оболочки	+	+	-	-	+	-
	25-суточная культура					
Гликоген	-	-	+	-	-	-
Липиды внутриклеточные	+	+	+	-	+	+
Липиды клеточной оболочки	-	-	-	-	+	+
Кислые белки цитоплазмы	+	-	+	-	+	+
Кислые белки клеточной оболочки	+	-	+	-	-	-

Примечание: (+) - положительная реакция
 (-) - отрицательная реакция

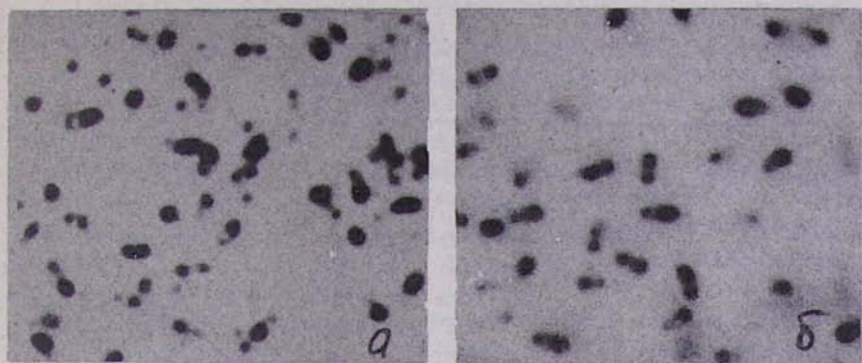


Рис. 2. Липиды в клетках полиплоидных штаммов клубеньковых бактерий, окраска суданом черным; а) – штамм №123аа₄₈, б) – штамм №123а. Увеличение в 3500 раз.

Кислые белки содержались в незначительном количестве в клеточной оболочке, в цитоплазме, где они распределены диффузно, и в виде отдельных гранул, очевидно в нуклеоидах. В отличие от родительского штамма некоторые полиплоидные формы в 3-суточной культуре давали отрицательную реакцию на кислые белки оболочки (123аа₄₈, 123ак₉^а₄₉, 123ак₃₁), цитоплазмы (123а₆₀, 123ак₉^а₄₉) и гранул (123аа₄₈, 123ак₃₁). Надо заметить, что у всех полиплоидов кислых белков в ядерных элементах было меньше или они совсем отсутствовали, в отличие от исходного штамма. В 25-суточной культуре почти у всех полиплоидных штаммов, за исключением №123аа₄₈, кислые белки в клеточной оболочке не были обнаружены.

Различия между штаммами по содержанию в клетках кислых белков не зависели от их специфичности.

Пероксидазная активность выявлялась по окрашенным зонам ферментативной активности в клетке. Зоны пероксидазной активности у исходного и полиплоидных штаммов были обнаружены в цитоплазме или в цитоплазматической мембране. Путем подсчета количества клеток, обладающих пероксидазной активностью, было найдено, что некоторые полиплоидные штаммы таких клеток имели больше, чем исходный штамм (табл. 2). Если у исходного штамма только 31,5% клеток содержали зоны пероксидазной активности, то у полиплоидов №№123а₆₀ и 123ак₉^а₄₉ – соответственно 88,5 и 60%. В старой культуре пероксидаза обнаруживается в основном в цитоплазме и ред-

Таблица 2

Пероксидазная активность полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха.

Штаммы	3-суточная культура			25-суточная культура		
	Количество клеток с пероксидазной активностью, %					
	всего	в цито- плазме	в цито- плазма- тической мембране	всего	в ци- то- плаз- ме	в цито- плазма- тической мембра- не
123-исходный	31,5	25,0	6,5	1,5	1,5	0
123а ⁶⁰ -поли- плоид	89,5	83,5	6,0	8,5	8,5	0
123аа ⁴⁸ -поли - плоид	38,0	35,0	3,0	5,0	5,0	0
123ак ^{9а49} -по- липлоид	60,0	52,0	8,0	8,0	7,5	0,5
123ак ³¹ -поли- плоид	48,5	44,0	4,5	6,0	6,0	0
123к ⁵⁹ -поли- плоид	40,0	32,5	7,5	4,5	4,5	0

ко - в цитоплазматической мембране. В этот период количество клеток с пероксидазной активностью значительно падает у всех изученных штаммов, но, тем не менее, все полиплоидные культуры содержат большее число клеток, обнаруживающих ферментативную активность, особенно штаммы №№ 123а⁶⁰, 123ак^{9а49} и 123ак³¹. У этих штаммов количество клеток с пероксидазной активностью составляет 6-8,5%, в то время как у исходного штамма - 1,5%.

Сравнивая цитохимические особенности исходного и полиплоидных штаммов, можно отметить различия между ними. Все полиплоидные культуры отличались от исходной, но в различной степени и независимо от полиплоидогена, с помощью которого они были получены. Так, штаммы №№ 123а⁶⁰ и 123аа⁴⁸, полученные при совместном выращивании клубеньковых бактерий с

азотобактером, отличались по многим признакам (наличию гликогена, липидов, кислых белков и пероксидазной активности). А штаммы №№ 123а₉а₄₉ и 123а₃₁, полученные при выращивании с азотобактером и путем воздействия колхицина, также имели различные свойства.

Изменчивость цитохимических особенностей клеток у полиплоидных штаммов не связана и с количеством ДНК на клетку, т. е. со степенью плоидности. Тем не менее повышение плоидности у штаммов *Rhizobium leguminosarum* вызывает заметные изменения в метаболизме клетки.

Не выявлено заметной корреляции между отдельными цитохимическими особенностями полиплоидных клеток и специфичностью штаммов к растению-хозяину. Но необходимо отметить, что штамм №123а₆₀, не изменивший специфичность, меньше отличался от исходного штамма, чем другие, образовавшие клубеньки на горохе и на люцерне. Общие признаки между исходным штаммом и полиплоидным №123а₆₀ наблюдались по наличию в клетках гликогена, липидов, но по наличию белков и активности пероксидазы этот штамм заметно отличался.

Выводы

1. Клетки полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха отличаются от клеток исходного штамма не только размерами, но некоторыми цитохимическими признаками (наличием и локализацией гликогена, липидов, кислых белков и зон пероксидазной активности).

2. Цитохимические различия между полиплоидными формами не зависят от полиплоидогена, с помощью которого они получены.

3. Различия в цитохимии клеток полиплоидных штаммов не коррелируют с изменением их специфичности к растению-хозяину.

Ե. Ն. Ավվախկու՝նվա, Մ. Վ. Հովսեփյան, Վ. Ս. Փիլոսյան

ՏԵՐ-ԲՈՒՑՄԻ ՆԿԱՏՄԱՄԲ ՍՊԵՑԻՖԻԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՓՈԽԱԾ
RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM - Ի ՊՈԼԻՊԼՈԻԴ ԶԵՎԵՐԻ
ՅԻՏՈՒՄԻԱԿԱՆ ԱՌԱՋՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Աշխատանքում բերված են ոլորի պալարաբաղադրիչների պոլիպլոիդ

ձեւերի ցիտոքիմիական հետազոտութիւնները արդյունքները, կապված նրանց սպեցիֆիկութեան փոփոխման հետ: Ելային կուլտուրայի և պոլիպլոիդ ձեւերի միջեւ ի հայտ են բերվել տարբերութիւններ, որոնք արտահայտվել են բլիշներում գլիկոզների, լիպիդների, թթու սպիտակուցների և պերօքսիդազի առկայութեամբ ու տեղաբաշխմամբ: Պոլիպլոիդ շտամների ցիտոքիմիական տարբերութիւնները չեն կորելացվում նրանց սպեցիֆիկութեան փոփոխման հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Аввакумова Е. Н., Шамцян М. Г., Пилосян В. С., Овсепян М. В. 1978. В сб.: Вопр. микробиол. (биологическая фиксация атмосферного азота), 6(16), Изд. АН Арм. ССР.
- Богданова Н. Е., Рапопорт А. И. 1977. В сб.: Микробиологический синтез аминокислот. Рига.
- Имшенецкий А. А., Жильцова Г. К. 1972. Микробиология 41, 5.
- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1968. Микробиология, 37, 5.
- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1976. Микробиология, 45, 1.
- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1977. Z. Allg. Mikrobiol. 17, 1.
- Имшенецкий А. А., Солнцева Л. И. 1974. Ann. microbiol. and enzymol., 24, 2.
- Каменева С. В. 1961. Тр. Института микробиологии АН СССР, 174.
- Кондратьева Т. Ф. 1977. Успехи микробиологии, 12.
- Попова Л. С. 1966. Микробиология, 35, 3.
- Laskowski W., Lochmann E., Wacker A., Stein W. 1960. Naturforsch., 15b, 11.