

Е. Н. АВБАКУМОВА, Л. И. РОЗАНОВА, М. Г. ШАМЦЯН

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ В СВЯЗИ С ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Эффективность симбиотической фиксации атмосферного азота определяется не только способностью клубеньковых бактерий образовывать клубеньки на корнях тех или иных бобовых растений, но и их активностью, т. е. способностью интенсивно фиксировать азот. Многочисленными исследованиями [1, 4, 5, 14, 15, 16 и др.] показано, что интенсивность симбиотической азотфиксации во многом зависит от специфичности, приспособленности отдельных штаммов клубеньковых бактерий не только к виду, но к разновидности и даже сорту бобовых растений. А свойство клубеньковых бактерий перекрестно заражать различные виды последних может служить причиной образования малоэффективных клубеньков. Поэтому для достижения эффективного симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями большое значение имеет правильный подбор обоих симбионтов.

Кроме того, в литературе встречаются указания на то, что клубеньковые бактерии в клубеньках при эффективном и неэффективном симбиозе имеют некоторые различия в строении [12, 13].

Настоящей работой ставилась задача с помощью цитологических и цитохимических методов проследить различие клубеньковых бактерий в чистой культуре и в клубеньках, образованных специфичными и неспецифичными по активности штаммами, а также штаммами, изменившими специфичность после пассажей через растение.

Материал и методика. С помощью цитологических и цитохимических методов исследовались следующие штаммы клубеньковых бактерий: № 31—активный, специфичный для кормовых бобов; № 31-46—4 раза пассированный через кормовые бобы; № 97—специфичный для вики, не активный, но вирулентный на кормовых бобах; № 97-46—4 раза пассированный через бобы.

Из чистой культуры клубеньковых бактерий делали препараты—мазки, из клубеньков—отпечатки срезов. Клубеньки кормовых бобов для анализа отбирали 3 раза в течение вегетации. Затем препараты фиксировали и окрашивали.

Для выявления нуклеоидов был использован метод окраски по Робинсу (НС1—Гимза). Полисахариды выявлялись с помощью реак-
— Шифф-йодная кислота (ШИК). Для уточнения природы ШИК-по-

ложительных веществ проводили экстракцию липидов **смесью метилового спирта, эфира и хлороформа**, а также обработку **препаратов лизосимом** для выявления мукополисахаридов.

Присутствие кислых мукополисахаридов определяли по **наличию метакромазина** при окрашивании толуидиновым синим и **альциановым синим** по Сиддмену. Контролем для выявления гиалуроновой кислоты служила обработка препаратов гиалуронидазой. Гликоген выявляли реакцией ШИК с контрольной обработкой препаратов амилазой, липиды—суданом черным по Мак-Манусу, белки—окраской прочным зеленым при pH 2,2 (кислые белки) и pH 8,5 (основные белки), по Олферту. В качестве контроля препараты обрабатывали пепсином и трипсином.

Рибонуклеиновую кислоту обнаруживали окраской пиронином по Браше (контроль—окраска пиронином после экстракции нуклеиновых кислот 5% трихлоруксусной кислотой).

Большинство цитологических и цитохимических методов воспроизведены по Пешкову [8] и Пирсу [9].

Препараты просматривали и фотографировали световым микроскопом Nu—Zeiss.

Цитология и цитохимия клубеньковых бактерий в клубеньках кормовых бобов. Сравнительное изучение влияния специфичного и неспецифичного штаммов клубеньковых бактерий на урожай кормовых бобов показало, что специфичный, активный штамм № 31 повысил урожай инокулированных растений вдвое по сравнению с неспецифичным штаммом № 97. Пассажи этих штаммов несколько увеличили их активность по сравнению с исходными, непассированными штаммами.

Клубеньковые бактерии в клубеньках кормовых бобов, образованных специфичным штаммом № 31 и пассированным № 31-4б, характеризуются наличием большого количества бактериоидных форм в начальный период и в период бутонизации растения (рис. 1). Неспецифичный штамм № 97 и пассированный № 97-4б образуют в клубеньках небольшое количество бактериоидных клеток даже в период бутонизации кормовых бобов (рис. 2). В период полного цветения, когда интенсивность азотфиксации начинает падать, клубеньки, образованные как активными, так и неактивными штаммами, содержат в основном **палочковидные формы бактерий**.

Цитологическое и цитохимическое исследование клубеньковых бактерий в клубеньках кормовых бобов, образованных штаммами различной активности, выявило заметное различие между ними (табл. 1).

Нуклеоиды (рис. 1—2) обнаруживаются в клетках бактерий в виде окрашенных гранул, в количестве 1—2 в палочковидных клетках и 1—4—в бактериоидных. Нуклеоиды клубеньковых бактерий в клубеньках, образованных специфичными и неспецифичными штаммами, различаются только по интенсивности их окраски. У штаммов 97 и 97-4б они окрашены менее интенсивно, чем у штаммов 31 и 31-4б. По наличию, распределению и интенсивности окраски полисахаридов в клетках клубеньковых бактерий различия между штаммами более заметны. Так,

полисахариды у клубеньковых бактерий штаммов №№ 31, 31-46 и 97-46 в начальный период вегетации растения-хозяина локализованы в клеточной оболочке в гранулах и иногда диффузно в цитоплазме. У штамма

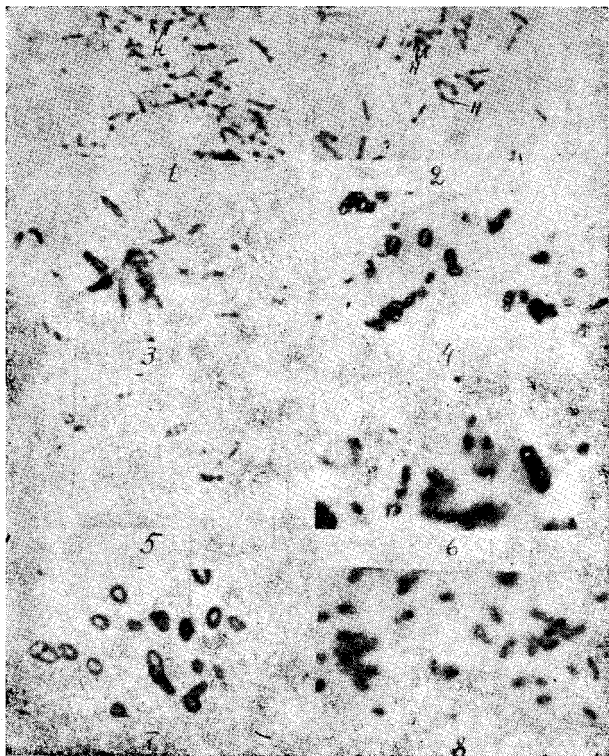


Рис. 1. Клубеньковые бактерии в клубеньках кормовых бобов (фаза бутонизации), образованных специфичным штаммом № 31. Фиксация жидкостью Карнуа, окраска нуклеоидов по Робиноу. $\times 2000$.

Рис. 2. Клубеньковые бактерии в клубеньках кормовых бобов (бутонизация), образованных неспецифичным штаммом № 97. Окраска по Робиноу.

Рис. 3. Клубеньковые бактерии, штамм № 97, 30-суточная культура. Фиксация формалином. Реакция ШИК на полисахариды.

Рис. 4. Клубеньковые бактерии, штамм № 97-46 (пассированный), 30-суточная культура. Реакция ШИК.

Рис. 5. Клубеньковые бактерии, штамм № 31, 3-суточная культура. Фиксация спиртом, окраска толудиновым синим оболочки клетки и гранул.

Рис. 6. Клубеньковые бактерии, штамм № 31-46 (пассированный), 3-суточная культура. Окраска толудиновым синим оболочки клетки, гранул и иногда узкого слоя капсулы.

Рис. 7. Клубеньковые бактерии, штамм № 97, 3-суточная культура. Окраска толудиновым синим слоя капсулы.

Рис. 8. Клубеньковые бактерии, штамм № 97-46 (пассированный), 3-суточная культура. Окраска толудиновым синим цитоплазмы и гранул клетки.

№ 97 в этот период полисахариды не были обнаружены. В период бутонизации кормовых бобов различия по штаммам проявились только в интенсивности реакции ШИК, а в период цветения штаммы 31 и 31-46 от

Таблица 1

Цитохимические особенности клубеньковых бактерий в клубеньках
кормовых бобов (вегетационный опыт)

Выявляемые вещества бактериальной клетки	Штамм 31				Штамм 31-46				Штамм 97				Штамм 97-46			
	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы	капсула	оболочка клетки	цитоплазма	гранулы

Образование 3 настоящих листьев

Гликоген	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Гиалуроновая кислота . . .	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Рибонуклеиновая кислота . .	—	—	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+
Кислые белки	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	+
Основные белки	—	+	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+

Бутонизация

Гликоген	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+
Гиалуроновая кислота . . .	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+
Рибонуклеиновая кислота . .	—	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+
Кислые белки	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+
Основные белки	—	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	—	+

Полное цветение

Гликоген	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+
Гиалуроновая кислота . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Рибонуклеиновая кислота . .	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	+
Кислые белки	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Основные белки	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	—

личались от штаммов 97 и 97-46 присутствием полисахаридов в цитоплазме клеток.

Дифференциация полисахаридов с помощью контрольной обработки препаратов ферментами (лизоцимом, гиалуронидазой и амилазой) дала возможность предположить наличие в клетках бактерий мукополисахаридов, в том числе и гиалуроновой кислоты, а также гликогена.

Установлено, что гиалуроновая кислота входит в состав полисахаридов клеточной стенки и капсулы. Она обнаруживалась в клеточной стенке или в узком внутреннем слое капсулы клубеньковых бактерий штаммов 31 и 31-46 до периода полного цветения растений, а у штаммов 97 и 97-46 только в один из периодов вегетации растения-хозяина, кратковременно. Окраску реактивом Шиффа внутрицитоплазматических гранул при проведении реакции ШИК, очевидно, можно объяснить наличием в них гликогена (растворяется амилазой), который в активную по азотфиксации фазу (бутонизация растений) был найден в клетках бактерий клубеньков у неспецифичных штаммов № 97 и 97-46 и отсутствовал у специфичных штаммов № 31 и 31-46.

беньковых бактерий в чистой культуре (табл. 2) показали, что изменение специфичности, т. е. приспособленности штамма к бобовому растению, влияет на отдельные признаки штамма. Так, после пассажа штамма № 31 через собственное растение (кормовые бобы) свойства штамма несколько изменились, что выразилось в появлении липидов и мукополисахаридов в клеточной стенке (3-суточная культура). Напротив, белки в клеточной стенке у пассированного штамма № 31-46 не были обнаружены, в то время как у исходного они присутствовали. Пассажи через бобы викового штамма № 97 более заметно изменили его свойства, чем штамма № 31. У исходного штамма № 97 липиды в клеточной стенке были найдены в очень незначительном количестве. Пассированный штамм № 97-46 (3-суточная культура) отличался от исходного № 97 наличием гиалуроновой кислоты в капсуле, отсутствием в цитоплазме рибонуклеиновой кислоты, а также кислых белков в клеточной стенке и в ядрах. Напротив, в клетках бактерий пассированного штамма появились основные белки, у исходного их не было.

По отдельным признакам (наличию и локализации липидов, гиалуроновой кислоты и основных белков) пассированный через бобы виковый штамм № 97 приобрел некоторые свойства, присущие штамму № 31, специфичному для кормовых бобов.

Можно отметить, что изменение специфичности клубеньковых бактерий в результате пассажа их через бобовое растение влияет на цитохимические признаки штамма и в чистой культуре (рис. 3—8). Однако закономерной корреляции между активностью штамма и его цитохимическими особенностями в чистой культуре мы не наблюдали.

Обсуждение результатов. В предыдущих наших исследованиях [6, 7] отмечалось, что в период бутонизации-цветения, т. е. в период наивысшей интенсивности фиксации азота, клетки клубеньковых бактерий в клубеньках не содержат гликогена. Отсутствие его в клетках клубеньковых бактерий наблюдали также Бергерсен [11] и Голубовская [16] при эффективном симбиозе.

При сравнении клубеньковых бактерий в клубеньках, образованных специфичными и неспецифичными штаммами, также наблюдается отсутствие гликогена у специфичных, активных штаммов в период бутонизации растения.

Специфичные штаммы отличались от неспецифичных по наличию и распределению в клетках полисахаридов, рибонуклеиновой кислоты и белков. Окраска РНК пиронином по Браше с контрольной экстракцией ее трихлоруксусной кислотой не является строго специфичной. И отсутствие РНК в клетках бактерий в отдельные периоды вегетации растения можно объяснить недостаточной чувствительностью метода. Тем не менее этот метод может быть использован для получения сравнительных результатов.

Изменение специфичности штаммов путем пассажа через бобовые растения влияло на их цитологические и цитохимические признаки, как в клубеньках, так и в чистой культуре.

Попытки связать отдельные свойства клубеньковых бактерий в чистой культуре с их азотфиксирующей способностью были сделаны многими исследователями [3, 10, 11, 18], но результаты этих исследований противоречивы. Цитологическое и цитохимическое изучение специфических и неспецифических, а также пассированных штаммов клубеньковых бактерий в чистой культуре показало, что имеющиеся между ними различия не могут служить показателями специфичности и активности клубеньковых бактерий.

Институт микробиологии
АН АрмССР

Поступило 29.IV 1968 г.

Ե. Ն. ԱՎԱԿԱՌԻՄՈՎԱ, Լ. Ի. ՌՈԶԱՆՈՎԱ, Մ. Գ. ՇԱՄՅԱՆ

**ՊԱՆԴԱՐԱՔԱՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲԶՋԱԲԱՆԱԿԱՆ ԵՎ ԲԶՋԱՔԻՄԻԱԿԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ՝ ԿԱՊԿԱՍՏ ՆՐԱՆՑ
ՍՊԵՑԻՖԻԿՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ՀԵՏ**

Ա. մ. ֆ. n. i. m

Ուսումնասիրվել են բակլայի պալարաբակտերիաների սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ շտամների, ինչպես նաև պասաժի ենթարկված շտամների միջև եղած բջջաբանական ու բջջաքիմիական տարբերությունները:

Միաժամանակ ուսումնասիրվել են նույն շտամների առանձնահատկությունները մաքուր կուլտուրայում:

Հետազոտությունների արդյունքներից պարզվել է, որ Թիթենածաղկավոր բույսի համար սպեցիֆիկ, ակտիվ շտամների վարակումից առաջացած պալարիկներում պալարաբակտերիաները տարբերվում են ոչ սպեցիֆիկ շտամների պալարաբակտերիաներից հետևյալով՝

1. Պալարիկներում բակտերոիդ ձևերի մեծ քանակի առկայությամբ:

2. Բույսերի կոկոնակալման փուլում պալարաբակտերիաների բջիջներում գլիկոլենի բացակայությամբ:

3. Կոկոնակալման փուլում բջիջների կապսուլում հիալուրոնաթթվի, բջջապլազմայում ՌՆԹ-ի և հիմնային սպիտակուցների առավել պարունակությամբ:

Թիթենածաղկավոր բույսի միջով պասաժի ենթարկված պալարաբակտերիաների շտամները նախնական շտամից տարբերվում են ոչ միայն իրենց ակտիվությամբ, այլ նաև առանձին բջջաբանական ու բջջաքիմիական առանձնահատկություններով: Պալարաբակտերիաների մաքուր կուլտուրայում սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ պասաժի ենթարկված և նախնական շտամների միջև եղած բջջաբանական ու բջջաքիմիական տարբերությունները փոխադարձաբար կապված չեն նրանց ակտիվության հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аввакумова Е. Н. Вопросы микробиологии, Сб. АН АрмССР, в. II (XII), 131—142, 1964.
2. Аввакумова Е. Н. Сб. Биологический азот и его роль в земледелии. Изд. Наука, М., 77—87, 1967.

3. Доросинский Л. М., Загорье И. В., Бузинашвили Д. М. Микробиология, **35**, в. 2, 319—322, 1966.
4. Калниньш А. Д. Тр. Инст. микробиологии АН Латв. ССР, **18**, 3—15, 1963.
5. Петросян А. П. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР, Ереван, 1959.
6. Петросян А. П., Аввакумова Е. Н. ДАН АрмССР, **39**, 1, 49—52, 1964.
7. Петросян А. П., Аввакумова Е. Н. Вопросы микробиологии, в. III (XII), 23—32, 1966.
8. Пешков М. А. Цитология бактерий, М., 1955.
9. Пирс Э. Гистохимия, Изд. И. Л., 1962.
10. Федоров М. В., Ласло Д. Изв. Тимирязевск. с/х акад., **2**, 61—82, 1956.
11. Шмидт Э. Ф. Микробиология, **33**, 2, 284—291, 1964.
12. Bergersen F. J. J. Gen. Microbiol., v. **13**, 3, 414—419, 1955.
13. Bergersen F. J., Briggs M. J. J. Gen. Microbiol., **19**, 482—490, 1958.
14. Erdman L. W., Means U. M. Agron. J., **45**, 12, 1953.
15. Erdman L. W., Means U. M. Agron. J., **48**, 8, 1956.
16. Gelin O., Bliat S. Agri. hort. genet., **22**, 1—2, 149—159, 1964.
17. Golebiowska J., Sygniewska U. Acta microbiol. polon., v. **11**, 4, 313—318, 1962.
18. Manil P., Wernimont H. J. Microbiol. and Serol., **27**, 1, 113—120, 1961.
19. Vincent J. M., Waters L. M. J. Gen. Microbiol., **9**, 3, 1953.