

25. *Slade H. D.* Arch. Biochem. Biophys., 42, 1, 204, 1953.
26. *Soru E., Zaharia O.* Revue roumaine de biochimie, 13, 1, 49—60, 1976.
27. *Stalon V., Pierard A., Wlame J. M.* Biochim. Biophys. Acta. 139, 1, 91—97, 1967.
28. *Trüper H. G., Pfennig N.* In The photosynthetic bacteria. Ed. R. K. Clayton W. R. Sistrom., Plenum Publishing Corp., 1978.
29. *Weathers P. J., Chee H. L., Allen M. M.* Arch. Microbiol., 118, 1, 1—6, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 10, 1982

УДК 575.2.23.576.6

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Е. Н. АВВАКУМОВА, М. В. ОВСЕПЯН

Изучены эффективность и некоторые цитохимические особенности полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны в связи со специфичностью симбиоза с растением-хозяином.

Ключевые слова: полиплоидные формы, клубеньковые бактерии, симбиоз.

Получение стабильных полиплоидных форм бактерий связано с многими трудностями. Для закрепления свойств полиплоидии необходима мутация [10, 11].

В работах Имшенецкого и Кондратьевой [3, 5] есть указания на более частое возникновение мутаций у полиплоидных форм микроорганизмов по сравнению с гаплоидными.

Выделенные нами полиплоидные формы клубеньковых бактерий гороха и люцерны по многим признакам отличаются от исходных штаммов, что указывает на возможность возникновения мутаций и изменений симбиотических свойств. Об изменении специфичности клубеньковых бактерий в связи с мутациями имеются сообщения и в литературе [4, 12].

Целью настоящей работы было изучение симбиотических взаимоотношений полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны с растением-хозяином.

Материал и методика. Для изучения симбиотических свойств клубеньковых бактерий использовались исходные и полиплоидные штаммы *Rh. leguminosarum* 5609—исходный, 5616—5621—полиплоидные, *Rh. meliloti* 5502—исходный и 5520, 5521—полиплоидные. В качестве растений-хозяев—горох (сортов Победитель, Виктория Мандорфская, Фельгенгейн, местный) и люцерна (местная).

Вирулентность и эффективность полиплоидных штаммов изучались в стерильных вегетационных опытах. Растения гороха и люцерны выращивались в вегетационных сосудах, в песчаной культуре. В песок вносилась питательная смесь по Гельригелю с уменьшенным количеством азота. Семена перед посевом стерилизовались концентрированной серной кислотой, затем промывались стерильной водой и при посеве инокулировались соответствующими штаммами клубеньковых бактерий. Эффективность штаммов определялась по сухому весу инокулированных растений.

Для изучения цитохимических особенностей клубеньковых бактерий готовились препараты-отпечатки клубеньков, которые фиксировались и окрашивались: для выявления клеточной стенки и общей морфологии—по Гутштейну, гликоген—йодным раствором Люголя [6], поли-β-оксимасляная кислота (ПОМ)—суданом черным после предварительной экстракции липидов горячим ацетоном, пероксидаза—бензидиновым методом [7]. Препараты просматривались под световым микроскопом. Подсчитывалось количество клеток в популяции, имеющих положительную реакцию. Учитывалось от 500 до 1000 клеток.

Результаты и обсуждение. Полиплоидия у крупноклеточных мутантов клубеньковых бактерий была установлена по увеличенным размерам клеток и нуклеоидов, количеству ДНК и белка на клетку и другим косвенным признакам [2].

Среди полиплоидных форм удалось выявить штаммы *Rh. leguminosarum*, образовавшие клубеньки на чужом растении-хозяине—люцерне, и штаммы *Rh. meliloti*, образовавшие клубеньки на горохе. Из 10-ти изученных полиплоидных штаммов *Rh. leguminosarum* 8 культур образовали клубеньки на горохе и люцерне, 2—только на горохе. Из 14-ти полиплоидов *Rh. meliloti* 6 образовали клубеньки только на люцерне, 8—на люцерне и горохе. Таким образом, отдельные полиплоидные штаммы изменили или расширили свою видовую специфичность.

Изучение специфичности полиплоидных штаммов в вегетационных опытах позволило найти различия между ними не только по вирулентности, но и по эффективности (табл. 1).

Таблица 1
Влияние полиплоидных форм клубеньковых бактерий на урожай гороха и люцерны (вегетационный опыт)

Штаммы	ДНК, мкг/млрд клеток	Образование клубеньков на растении-хозяине	Сухой вес растений, %				
			горох (сорта)				лю- церна
			Победитель	местный	Виктория Мандорф- ская	Фельген- гейн	
Контроль (без заражения)	—	—	100	100	100	100	100
<i>Rh. leguminosarum</i>							
5609 — исходный	3,6	горох	95,5	121,4	99,3	138,4	82,3
5616 — полиплоидный	6,5	горох	132,8	—	—	157,6	—
5617 — полиплоидный	8,5	горох, люцерна	125,4	124,1	108,14	137,2	130,9
5618 — полиплоидный	7,4	горох, люцерна	160,6	118,9	99,04	137,6	121,9
5619 — полиплоидный	15,9	горох, люцерна	114,3	133,3	117,4	—	118,6
5621 — полиплоидный	5,0	горох	99,5	—	—	—	101,1
<i>Rh. meliloti</i>							
5502 — исходный	2,6	люцерна	—	—	—	75,0	123,1
5520 — полиплоидный	11,4	люцерна	—	—	—	—	125,7
5521 — полиплоидный	15,0	люцерна, горох	—	—	—	119,0	89,2

Некоторые полиплоидные культуры *Rh. leguminosarum* оказались более эффективными по сравнению с исходным штаммом на своем хозяине—горохе и на новом—люцерне. Эти штаммы повысили вес инокулированных растений на 10—40%.

Все гороховые штаммы, исходный и полиплоидные, проявили сортовую специфичность по отношению к гороху. Повысив урожай одного сорта гороха, они слабо влияли на урожай другого сорта. Штамм 5609—исходный оказался эффективным для сортов местного и Фельгегейна, повысив вес растений на 21 и 38%. Полиплоиды несколько изменили и расширили сортовую специфичность, положительно воздействуя на большее количество сортов. Так, штамм 5617 был эффективным для всех изученных сортов, штамм 5618—для 3 из 4-х сортов. Полиплоид 5621 испытывался на одном сорте гороха и оказался для него неэффективным.

Отдельные полиплоидные штаммы *Rh. leguminosagum* образовали клубеньки и на люцерне, увеличив ее урожай на 18—30%. Пятилетние опыты показали, что полиплоидный штамм клубеньковых бактерий гороха—5618—был более эффективным на люцерне, чем активный люцерновый штамм 5502. Положительный, эффективный симбиоз с новым растением-хозяином люцерной был отмечен и для гороховых штаммов 5618 и 5619.

Полиплоидные формы *Rh. meliloti* (табл. 1) также изменили специфичность к растению-хозяину и образовали клубеньки на горохе—новом хозяине. Штамм 5521, кроме того, еще и повысил вес растений по сравнению с контролем и с исходным штаммом 5502. В симбиозе со своим хозяином—люцерной этот штамм не был эффективным, хотя и образовал клубеньки. Другой полиплоидный штамм *Rh. meliloti*—5520, наоборот, был эффективным в симбиозе с люцерной, повысив вес растений почти на 26%, а на горохе клубеньков не образовал.

Изучение цитологических и цитохимических особенностей клубеньковых бактерий, исходных и полиплоидных форм в клубеньках растений-хозяев позволило найти некоторые различия в их морфологии и метаболизме. Штаммы клубеньковых бактерий гороха и люцерны в клубеньках специфичных для них растений, т. е. при эффективном симбиозе, образовали больше бактериоидных клеток, чем в клубеньках неспецифичных растений. Так, полиплоидные штаммы *Rh. leguminosagum*, изменившие свою специфичность, образовали бактериоидные формы в клубеньках нового для них хозяина—люцерны и не образовали их в клубеньках гороха, если симбиоз был неэффективным. Причем форма бактериоидов в клубеньках люцерны была характерной для люцерновых культур.

То же относится и к полиплоидным штаммам *Rh. meliloti* с измененной специфичностью. Этот признак (количество бактериоидов), коррелирующий с эффективностью симбиоза, характеризует специфичность взаимоотношений клубеньковых бактерий с растением-хозяином.

При определении количества бактерий в клубеньках, содержащих гликоген, поли- β -оксималяную кислоту (ПОМ) и пероксидазу при специфичном (эффективном) и неспецифичном симбиозах, были найдены различия между ними (табл. 2). Количество гликогена и ПОМ в клетках бактерий клубеньков находится в обратной зависимости от эффективности, а следовательно, и специфичности симбиоза.

Штаммы 5618 и 5616, давшие наибольшую прибавку урожая гороха в период бутонизации, почти или совсем не содержали клеток с гликогеном. Штамм 5609—исходный и 5621—неактивный имели соответственно 63 и 81% клеток, содержащих гликоген. Не было найдено в клетках эффективных штаммов 5617, 5618 и поли- β -оксимасляной кислоты.

Таблица 2

Цитологические особенности полиплоидных форм клубеньковых бактерий в клубеньках гороха и люцерны*

Штаммы	Урожай, %	Горох			Урожай, %	Люцерна		
		Клетки с положительной реакцией, %				Клетки с положительной реакцией, %		
		гликоген	ПОМ	пероксидаза		гликоген	ПОМ	пероксидаза
Rh. leguminosarum								
560 — исходный	95,5	63,1	17,0	8,9	75,0	клубеньки не образовал		
5616 — полиплоидный	132,8	0	—	62,3	—	—		
5617 — полиплоидный	125,4	5,7	0	59,7	125,2	14,3	0	4,6
5618 — полиплоидный	160,6	2,1	0	71,1	121,9	2,1	4,3	5,6
5621 — полиплоидный	99,05	81,1	—	23,1	100,0	клубеньки не образовал		
Rh. meliloti								
5502 — исходный	75,7	клубеньки не образовал			114,0	2,1	0	2,8
5520 — полиплоидный	—	—	—	—	125,6	1,8	0	16,6
5521 — полиплоидный	120,2	11,0	43,0	64,4	80,8	64,4	15,2	7,8

* 0—отсутствие клеток с положительной реакцией, —исследования не проводились.

Штаммы клубеньковых бактерий гороха, ставшие специфичными для люцерны, также имели небольшое количество клеток, содержащих гликоген и ПОМ (5617 и 5618) в клубеньках люцерны.

У люцернового полиплоидного штамма 5521 в симбиозе с новым хозяином—горохом гликогена было меньше (11%), чем в симбиозе с люцерной (64%). В отношении поли- β -оксимасляной кислоты такой закономерности для штамма 5521 не найдено. Возможно, этот штамм является малоэффективным для гороха и неэффективным для люцерны. Наличие или отсутствие гликогена и ПОМ в клетках бактерий клубеньков указывает на изменение эффективности, а следовательно, и специфичности у полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны.

В фазы предбутонизации и бутонизации растений наибольшее количество зон пероксидазной активности наблюдается у полиплоидных штаммов. Среди полиплоидных культур клеток с пероксидазной активностью у эффективных штаммов больше, чем у неэффективных. Полиплоидные штаммы в симбиозе с горохом обладали большей пероксидазной активностью, чем в симбиозе с люцерной.

Подобная разница, возможно, зависит от продолжительности вегетационного периода этих культур и от степени азотфиксирующей активности, которая у многолетних растений бывает наивысшей на второй год жизни.

Таким образом, некоторые полиплоидные формы клубеньковых бактерий с изменением плоидности изменили свою специфичность к ра-

стению-хозяину, на что указывают и признаки, связанные с эффективностью симбиоза (наличие в клетках бактерий клубеньков гликогена, поли- β -оксимасляной кислоты, пероксидазы). О связи между количеством гликогена и поли- β -оксимасляной кислоты в клетках бактерий с эффективностью симбиоза сообщается и в литературе [1, 8, 9].

В результате исследований можно предположить, что наряду с изменением плоидности у клубеньковых бактерий произошли и некоторые мутации, изменившие их симбиотические особенности и закрепившие свойства полиплоидии.

Получение полиплоидных форм с измененной специфичностью дает возможность изучать вопросы симбиотических взаимоотношений клубеньковых бактерий с растением—хозяином, а также использовать признак полиплоидии для отбора эффективных штаммов для производства.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 16.IV 1982 г.

ՈՒՈՒԻ ԵՎ ԱՌՎՈՒՅՑԻ ՊԱՂԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՊՈՂԻՊՈՒԻ ԶԵՎԵՐԻ
ՍԻՄԲԻՈՏԻԿ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ե. Ն. ԱՎԱԿՈՒՄՈՎԱ, Մ. Վ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ

Ուսումնասիրված է ղրոռի և առվույտի պայլարաբակտերիաների պոլիպլոիդ ձևերի էֆեկտիվությունը և մի քանի ցիտոքիմիական առանձնահատկություններ տեր բույսի նկատմամբ՝ կապված սիմբիոզի սպեցիֆիկության փոփոխության հետ:

SYMBIOTIC PROPERTIES OF POLYPLOID FORMS OF ROOT
NODULE BACTERIA *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*
AND *RHIZOBIUM MELILOTI*

E. N. AVVAKUMOVA, M. V. OVSEPIAN

The effectivity and some cytochemical properties of polyploid forms of root nodule bacteria *Rh. leguminosarum* and *Rh. meliloti* are investigated in connection with the change of specificity of symbios with host plant.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аввакумова Е. Н., Шамцян М. Г., Пилосян В. С., Овсепян М. В. Вопросы микробиологии, 6, 62—72, Ереван, 1973.
2. Аввакумова Е. Н., Овсепян М. В., Степанян Т. У. Докл. АН СССР, 225, 4, 974—977, 1975.
3. Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. Микробиология, 41, 3, 494—499, 1972.
4. Имшенецкий А. А., Парийская А. Н. Микробиология, 42, 2, 280—300, 1973.
5. Кондратьева Т. Ф. Успехи микробиологии, 12, 102—111, 1977.
6. Пешков М. А. Цитология бактерий, М., 1955.
7. Пирс Э. Гистохимия, М., 1962.
8. Романов В. И., Федулова Н. Г., Шрамко В. И., Молчанов М. А., Кретович В. Л. Физиол. растений, 25, 4, 726—730, 1978.
9. Черменская И. Е., Петрова А. Н., Кретович В. Л. Докл. АН СССР, 215, 2, 481—483, 1974.
10. Kvetkas M. Y., Zelle M. R. Microbiol. Gen Bull., 27, 7, 1967.
11. Kvetkas M. Y., Krisch R. E., Zelle M. R. J. Bacteriol., 103, 399, 1970.
12. Schwinghamer E. A. Amer. J. Bot., 49, 269—277, 1962.