

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ОБОЛОЧКОЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОРНЕЙ ГОРОХА И ЛЮЦЕРНЫ

Е. Н. АВБАКУМОВА, С. А. АРУТЮНЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация — Показано, что компоненты оболочки изолированных растительных клеток корней гороха и люцерны по-разному реагируют на инфицирование специфичными и неспецифичными штаммами. Во внешнем слое оболочки растительных клеток обнаружены гликопротеиды, ионизированные формы кальция, магния, марганца, а также гликозиды.

Անոտացիա — Պարզարանվել է պարարարակտերիաների սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ շտամների ազդեցութթյունը ոլորի և աոֆուլտի արմատներից մեկուսացված բուսական բջիչների թաղանթի վրա:

Սպեցիֆիկ շտամներով վարակելիս մեկուսացված բջիչների թաղանթի արտաքին շերտում հայտնարեցվել են գլիկոպրոտեիդներ, գլիկոզիդներ, և Ca-ի, Mg-ի, Mn-ի իոնացված ձևեր:

Abstract — Different reactions of membrane components of isolated cells of pea and alfalfa on the infection of specific and non-specific strains of nodule bacteria was revealed. During the infection of specific strains on the external layer of membrane isolated cells glycoproteids, ionized forms of Ca, Mg, Mn and also glycosides were found.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, культура ткани гороха и люцерны, лектины.

Считается, что одним из факторов, определяющих связывание клубеньковых бактерий с корневыми волосками, является взаимодействие между лектинами растений и полисахаридами бактерий [5—7].

Данные о химических и биологических свойствах различных лектинов обобщены в обзорах [10—13]. Лектины, растительные агглютинины, близки к гликопротеидам и некоторым гликозидам. Их активность обусловлена наличием биополимеров, связанных с CN-ацетил-Д-глюкозаминами или близкими производными [13].

Для взаимодействия лектинов с сахарами необходимо присутствие в них дивалентных катионов [12]. При утрате лектином  $Mn^{2+}$  сильно снижается активность гемагглютинации [10].

Взаимодействие клубеньковых бактерий с лектинами растений удобно было бы изучать на модели, т. е. в ассоциации изолированных корневых клеток с клубеньковыми бактериями. Специфичность этой ассоциации зависит от вида растения, сорта, физиологического состояния ткани и т. д. [5, 6].

Цель настоящего исследования состояла в изучении реакции некоторых компонентов оболочки изолированных растительных клеток корней бобовых на заражение клубеньковыми бактериями различной специфичности.

**Материал и методика.** Исследования проводили на ассоциации изолированных клеток корней гороха и люцерны с клубеньковыми бактериями гороха (*Rhizobium leguminosarum*, шт. 5609), люцерны (*Rh. meliloti*, шт. 5502), сои (*Bradyrhizobium japonicum*, шт. 679), эспарцета (*Rh. simplex*, шт. 5891).

Азотфиксацию ассоциаций определяли по ацетилен-восстанавливающей активности нитрогеназы, на газовом хроматографе марки «Цвет», модели 4-67 [2]. Для определения нитрогеназной активности ассоциации ткань предварительно выращивали в пенциллиновых флаконах (объем 15 см<sup>3</sup>) на агаризованной среде Мурасиге Скуга с уменьшенной дозой азота (до 0,1 от нормы) и добавленным дрожжевым экстрактом. После 7 сут роста ткань инокулировали клубеньковыми бактериями и через 7-9 сут совместного роста определяли ацетилен-восстанавливающую активность, которую выражали в мкг азота на 1 г сухой ткани в час.

Мертвые клетки растительной ткани выявляли путем окраски их метиленовым синим в концентрации 1/100000 и подсчетом под микроскопом.

Компоненты оболочки растительных клеток, которые могли бы входить в состав лектина; определяли с помощью цитохимических методов [3].

Окраска метилевковыми синими служила для определения способности реактивных групп лектина к метакромиину.

Для обнаружения белка применяли реакцию ингибитри-реактив Шиффа, методом Питтера и Олесона определяли кислые мукополисахариды и мукопротеиды. Метилен выявляли титановым методом, кальций-обработкой препаратов 3%-ным H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Марганец определяли реакцией с двуокисью свинца [1]. Гликозиды в ткани осаждали абсолютным этанолом и дифференцировали путем растворения в воде и аммиаке [4].

Препараты инокулированной ткани просматривали под световым микроскопом марки Nu Zeiss X300-400.

**Результаты и обсуждение.** Данные о специфичности воздействия различных видов клубеньковых бактерий на изолированную ткань гороха и люцерны при их совместном культивировании приведены в табл. 1, 2.

Наибольший прирост ткани гороха и люцерны отмечался при заражении ее специфичными штаммами 5609 (*Rh. leguminosarum*), 5502 (*Rh. meliloti*). Неспецифичные для гороха и люцерны виды клубеньковых бактерий, наоборот, снижали вес инокулированной ткани по

Таблица 1. Влияние клубеньковых бактерий различной специфичности на изолированную ткань корней гороха и люцерны

Штаммы	Ткань гороха			Ткань люцерны				
	вес ткани через 20 сут, г	мертвые клетки, %		азот, мкг/г ткани час	вес ткани через 20 сут, г	мертвые клетки, %		азот, мкг/г ткани час
		через 4 сут	через 20 сут			через 4 сут	через 20 сут	
Контроль	100	8.72	19.59	5.6	100	14.8	25.0	0
5609 ( <i>Rh. leguminosarum</i> )	104.9	3.86	22.63	33.07	29.2	18.4	50.1	0
5502 ( <i>Rh. meliloti</i> )	66.3	37.5	77.8	5.0	142.7	11.47	19.1	22.5
649 ( <i>B. japonicum</i> )	56.8	19.8	39.17	6.62	59.6	28.2	71.4	0
5891 ( <i>Rh. simplex</i> )	73.8	0.85	31.53	—	43.5	19.7	37.0	—

Таблица 2. Влияние клубеньковых бактерий различной специфичности на компоненты лектина в оболочке изолированных клеток гороха и люцерны

Штаммы	Ткань гороха		Ткань люцерны	
	компоненты оболочки			
	внешний слой	внутренний слой	внешний слой	внутренний слой
Контроль	мукопротенды гесперидин $Mg^{2+}$	глико-и мукопротенды гесперидин ионы $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$	мукопротенды	гликопротенды $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$
5609 (Rh. leguminosarum)	гликопротенды $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ гесперидин	гликопротенды $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$	мукопротенды $Mg^{2+}$	гликопротенды $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$
5502 ((Rh. meliloti)	мукопротенды $Mg^{2+}$	гликопротенды $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$	глико-и мукопротенды гесперидин ионы $Ca^{2+}$	гликопротенды гесперидин ионы $Ca^{2+}$
649 (B. japonicum)	мукопротенды $Mn^{2+}$	гликопротенды гесперидин $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$	мукопротенды $Mg^{2+}$	гликопротенды гесперидин ионы $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$
5891 (Rh. smplicis)	мукопротенды ионы $Ca^{2+}$ , $Mn^{2+}$	гликопротенды $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$	мукопротенды $Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$

сравнению с контролем. В специфичной ассоциации ткани с клубеньковыми бактериями отмечено также наименьшее количество мертвых растительных клеток. Ткань гороха в ассоциации с шт. 5609 содержала 3,86% мертвых клеток через 4 сут совместного роста и 22,63% — через 20 суток. В неспецифичной ассоциации со штаммами чужих видов (5609, 649, 5891) количество мертвых клеток значительно увеличивается, особенно в случае со штаммом 5502, до 77,8% через 20 суток.

Подобная закономерность отмечена и в ассоциации с корневой тканью люцерны (табл. 1). Наименьшее количество мертвых клеток у люцерны было при культивировании со своим штаммом, 5502, и наибольшее — с неспецифичными штаммами 5609, 649, 5891.

Определение нитрогеназной активности ассоциации подтвердило специфичность взаимоотношений клубеньковых бактерий с изолированной тканью (табл. 1). Нитрогеназная активность была обнаружена только в специфичной ассоциации ткани гороха со шт. 5609 и ткани люцерны со шт. 5502. Неспецифичные штаммы не проявляли нитрогеназ-

ной активности или она была на уровне контроля (для гороха), поскольку известно, что клетки растений могут выделять эндогенный этилен.

Изучение реакции оболочки растительных клеток на инокуляцию клубеньковыми бактериями выявило изменение химического состава ее в зависимости от специфичности штаммов (табл. 2).

Определяли наличие и локализацию компонентов, которые могли бы входить в состав лектина. О наличии гликопротеидов и мукопротеидов, которые отличаются друг от друга только содержанием гексозамина [3], свидетельствует отсутствие метакромазии при окраске метиленовым синим, а также отсутствие обесцвечивания метиленового синего при pH ниже 4,0. С помощью метиленового синего в оболочке растительных клеток были обнаружены и мукополисахариды, которые при окраске дают метакроматическое окрашивание. Результаты окраски метиленовым синим были подтверждены выявлением муко- и гликопротеидов, белков, полисахаридов с помощью других методов (Риттера и Олесона, реакции нингидрин—реактив Шиффа, алыцианового синего по Стивену), а также просмотром препаратов в поляризованном свете, так как лектин обладает свойством двойного лучепреломления—дихроизмом [13].

Было найдено, что гликопротеиды локализованы в основном в среднем слое оболочки, а мукопротеиды—во внешнем. Лишь при инокуляции растительных клеток специфичными штаммами гликопротеиды обнаруживаются во внешнем слое оболочки (шт. 5609—на горохе и 5502—на люцерне).

Следует отметить, что строгоспецифичной цитохимической реакции для глико- и мукополисахаридов нет и разграничение их достаточно условно. Тем не менее, сопоставление результатов применения различных методов выявило некоторые различия в окраске, дихроизме между компонентами клеточной оболочки внешнего и среднего слоев. Кроме того, в клеточной оболочке растительных клеток были обнаружены пониженные формы кальция, магния, марганца и некоторые гликозиды типа гесперидина и инулина.

В специфичной ассоциации ткани и клубеньковых бактерий внешний слой оболочки растительных клеток содержал катионы кальция, магния, марганца. Иногда катионы металлов находились снаружи клетки.

При длительном выдерживании инокулированной ткани в абсолютном этаноле выпадают кристаллы гликозидов, в специфичной ассоциации они локализованы во внешнем слое оболочки растительных клеток. Гликозиды, нерастворяющиеся в воде и растворяющиеся в аммиаке, определены как гесперидин. Инулин наблюдался в виде крупных сферокристаллов и обладал двойным лучепреломлением, легко растворялся в воде. В неспецифичной ассоциации ткани гороха со шт. 5502, 649, 5891 и люцерны со шт. 5609, 649, 5891 во внешнем слое оболочки растительных клеток не были выявлены гликопротеиды, те или иные катионы металла и гесперидин, они были обнаружены во внутреннем слое оболочки.

При инокуляции ткани гороха шт. 5502 во внешнем слое оболочки отсутствовали  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , а при заражении шт. 649 (В. japonicum) отсутствовали  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , у люцерны  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  не найдены в ассоциации со шт. 5609, 649 и 5891.

Результаты проведенных исследований подтверждают литературные данные о значительной роли лектина в процессе «узнавания» специфических клубеньковых бактерий. Кроме того, была выявлена специфичность реакции компонентов оболочки изолированных растительных клеток на инфицирование специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий. При инфицировании специфическими штаммами во внешнем слое клеточной оболочки обнаружены гликопротеиды, геопериды и нонизированные формы кальция, магния и марганца, которые, очевидно, входят в состав лектина и реагируют с клубеньковыми бактериями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Большой практикум по физиологии растений. Под ред. Б. А. Рубина, Л., 1978.
2. Методические указания по использованию ацетилсерового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. Л., 1982.
3. Пирс Э. Гистология. М., 1962.
4. Прокина М. И. Ботаническая микротехника. Л., 1960.
5. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. Под ред. Е. П. Старенкова. Киев, 1984.
6. Шацян М. Г., Авакхумова Е. Н., Чабвалян М. А. Докл. АН СССР, 222, 3, 710—743, 1975.
7. Dazzo I. B., Hrabec E. M., Urbano M. R., Sherman J. E., Truchet G. In: Current perspectives in nitrogen fixation, 292—295, Canberra, 1981.
8. Hubbel D. H. Bioscienc., 37, 11, 832—837, 1981.
9. Kamberger W. Arch. Microbiol., 121, 1, 63—90, 1979.
10. Lis H., Sharon N. Biochem., 42, 541—574, 1973.
11. Novakova N., Kovarik Y. Biochem. Biophys. Acta, 359, 323—333, 1974.
12. Pavlova M., Ticha M., Enlicher G., Kestler Y., Kacmarc J. Biochem. Biophys., 252, 368—395, 1971.
13. Roth Y. The lectins, 1973.

Получено 9.1.1986 г.

Восток. м. Армения, т. 40, № 4, 289—293, 1987

УДК 591.1.05

### ИЗОЭНЗИМЫ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ У ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *AGANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY.

А. А. АГАДЖАНИН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблематики лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Аминотация — 5-лицинол фасолевого зерновки орнитин-5-трансминаза и пирролидин-5-карбоксилат редуктаза представлены двумя изоэнзимами, у кукурузы — одним с более низкой активностью. ПХМБ, гидроксиметил, АДФ.