



Биол. журн. Армении, 4 (65), 2013

КОРНЕВОЙ СОК КАК ЭКЗОГЕННЫЙ ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА АДГЕЗИЮ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Փ.Տ. МАТЕВОСЯՆ, Տ.Ա. АРУТЮՆՅԱՆ, Դ.Ս. СТЕПАՆՅԱՆ, Ն.Մ. АЛЕКСԱՆՅԱՆ

Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА
arm biotech@yahoo.com

В лабораторных опытах исследовалась адгезия клубеньковых бактерий при воздействии корневого сока бобовых растений. Выявлено, что корневой сок стимулирует адгезию специфических клубеньковых бактерий на корневых проростках по сравнению с водными суспензиями до 13.5%. Адгезионная способность достигает максимума в экспоненциальной фазе роста клеток бактерий.

Клубеньковые бактерии – адгезия – корневые проростки – корневой сок

Լաբորատոր փորձերում ուսումնասիրվել է թիթեռնաճաղկավոր բույսերի արմատահյուլի ադհեզիվությունը պալարաբակտերիաների ադհեզիայի վրա: Բացահայտվել է, որ արմատահյուլը մինչև 13.5% խթանում է յուրահատուկ պալարաբակտերիաների ադհեզիան արմատածիլերի մակերեսին, ջրային սուսպենզիաների համեմատությամբ: Ադհեզիայի ունակությունը հասնում է իր առավելագույն մեծությանը մանրէների աճման էքսպոնենցիալ փուլում:

Պալարաբակտերիաներ – ադհեզիա – արմատածիլեր – արմատահյուլ

The influence of leguminous plants root sap on nodule bacteria adhesion was studied by laboratory experiments. It was revealed that root sap stimulates nodule bacteria adhesion to rootlets surface up to 13.5% in comparison with the water suspensions. Adhesion property of nodule bacteria achieves its maximum at exponential phase of bacterial cells growth.

Nodule bacteria – adhesion – rootlets – root sap

Среди микроорганизмов, способных восстанавливать молекулярный азот воздуха, особое место занимают клубеньковые бактерии, которые в симбиозе с бобовыми растениями принимают наиболее активное участие в этом процессе. Взаимоотношение бобовых растений с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* представляет собой уникальный, многоэтапный процесс, подверженный влиянию различных экзогенных и эндогенных факторов, в результате которого восстанавливается молекулярный азот воздуха, почва обогащается азотом, и таким образом повышается плодородие почвы. Использование биологического азота в сельском хозяйстве – один из наиболее эффективных путей улучшения азотного питания растений [2].

В последние годы появилась информация о факторах органической и неорганической природы, которые способствуют выживанию ризобий в почве и их конкуренции за колонизацию корней растений. Результаты подобных исследований имеют большое значение для создания высокоэффективных бактериальных препаратов,

позволяющих наиболее экономичным и экологически чистым способом получать стабильно высокие урожаи бобовых растений, снижая при этом потребность в азотных удобрениях, что положительно сказывается на качестве сельскохозяйственной продукции [4]. Известно, что перспективность применения того или иного штамма бактерий определяется его способностью колонизировать ризоплану и ризосферу растений. Первичным этапом этого процесса является адгезия микроорганизмов к поверхности прорастающего семени растения или к его корням. Важная роль в контактном взаимодействии бактерий с другими материалами принадлежит свойствам поверхности клеток [3]. Способность клеток бактерий к адгезии на различных поверхностях является их жизненно важным приспособлением к обитанию в разных экотопах и к разным неблагоприятным условиям. В адсорбированном состоянии бактерии легче приспосабливаются к неблагоприятным условиям среды. Очевидно, что бактерии обладают механизмами регуляции этого процесса [8, 12].

Ризобияльные бактерии передвигаются к клеткам корней также благодаря компонентам, содержащимся в корневых волосках, “узнавая” растения хозяина, инфицируют их и начинают размножаться. В клетках корневых волосков бобовых синтезируются особые вещества, в частности, флавоноиды и изофлавоноиды, а также лектины, находящиеся на наружной поверхности корневых волосков, способствующие прикреплению бактерий к корневым волоскам [4, 11]. В этой связи интересным является исследование влияния корневого сока на адгезию клубеньковых бактерий. Так как нами был изучен ряд признаков, влияющих на адгезию клубеньковых бактерий: величина центробежной силы, время контакта с адсорбентом в зависимости от вида и т.д., мы задались целью исследовать влияние корневого сока на величину адгезии [1]. Их влияние на ранние этапы формирования бобово – ризобияльного симбиоза не исследовано.

Целью настоящей работы было изучение влияния корневого сока на величину адгезии специфичных клубеньковых бактерий гороха, эспарцета, нута и сои, учитывая, что метаболиты растения-хозяина могут оказывать влияние на процесс внедрения бактерий в корневые волоски, а также изучение адгезии в зависимости от возраста культуры клубеньковых бактерий.

Материал и методика. Штаммы выращивали на бобовом агаре следующего состава (%): бобовый экстракт-5,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,05; K_2HPO_4 - 0,05; MgSO_4 - 0,02; NaCl - 0,02; CaSO_4 - 0,01; сахара - 1, для медленно растущих - маннит - 2, при 26°C. Объектом исследования служили коллекционные штаммы клубеньковых бактерий различных видов, хранившиеся в лаборатории азотфиксирующих микроорганизмов Научно-производственного центра “Армбиотехнологии” НАН РА: *Rhizobium leguminosarum* штаммы 5601, 5609, *Rh. simplex* шт. 5879, 5881, *Mezorhizobium ciceri* шт. 6042, 6050, выделенные из разных почвенно-климатических зон Армении. *Bradyrhizobium japonicum* шт. 5789 выделен из растений сои, привезенных из Грузии, и штамм 5805, полученный из коллекции ВНИИСХМ. Все штаммы активно азотфиксирующие, предварительно проверенные нами в условиях вегетационного опыта на стерильном речном песке, обогащенном питательной смесью Прянишникова /минеральный азот 0,25% от нормы/, а также в полевых условиях [6]. Способность клубеньковых бактерий к адгезии определяли в лабораторных опытах.

Для получения стерильных корневых проростков отобранные семена гороха, эспарцета, нута стерилизовали концентрированной серной кислотой в течение 7-8 мин. Семена сои стерилизовали 20 %-ной перекисью водорода 12 мин. Затем все семена промывали стерильной водой до нейтральной реакции воды. Подготовленные таким образом семена проращивали на стерильном водном агаре в чашках Петри в термостате при 26°C.

Для опытов отбирали трехдневные исходные проростки длиной 2 см, которые инокулировали путем погружения их в суспензии культур – гороха, эспарцета, нута и сои, приготовленной на корневом соке, 30 мин. В качестве контроля использовали одновозрастные проростки, инокулированные водной суспензией клубеньковых бактерий. Для получе-

ния корневого сока использовали свежие корни всех испытуемых растений, полученные из вегетационных опытов в фазе полной бутонизации и начала цветения растения. Корни тщательно промывали водой, затем растирали в ступке, разбавляя водой 1:5. Полученный таким путем сок разливали в пробирки по 10 мл и подвергали дробной стерилизации под текучим паром 3 дня : первый день – 45, второй и третий дни по 30 мин.

При изучении величины адгезии клубеньковых бактерий учитывали разные экспозиции культивации клеток, а также влияние корневого сока – как экзогенного фактора. Под величиной адгезии (число адгезии γF) понимали количество клеток, прилипших к корневым проросткам, выраженное в процентах от их исходного количества. На практике этот показатель рассчитывали

по формуле $\gamma F = \frac{N \cdot 100}{N_0}$, где N_0 – число микробов, первоначально адсорбированных на

испытуемой поверхности, N – число микробов, оставшихся после воздействия центробежной силы, то есть после десорбции. Количество жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в исходных и адгезированных, до и после центрифугирования, и метод определения адгезии на корневых проростках проводили описанным нами ранее в работе [1]. Эксперименты проводили в 5-6-кратной повторности. В таблицах приведены средние величины полученных данных.

Результаты и обсуждение. По литературным данным, увеличение подвижности клеток и количества жгутиков и выростов на их поверхности является фактором наибольшего прикрепления к адсорбенту [10]. В наших опытах при инокуляции корневых проростков различных видов бобовых – гороха, эспарцета, нута и сои активными штаммами клубеньковых бактерий в динамике их роста выявлена неодинаковая интенсивность прикрепления бактериальных клеток к корням растения-хозяина. Максимальная адгезия клубеньковых бактерий на проростках гороха, эспарцета и нута проявляется при их контакте с суспензиями в двухсуточной культуре. Полученные данные показывают, что число адгезии $[\gamma F]$ у штаммов из клубеньков гороха 5601 и 5609 составляет 59.5 и 58.3%. А при контакте с суточной и трехсуточной культурой при одинаковых исходных количествах жизнеспособных бактерий в суспензиях число адгезии заметно снижается [табл. 1].

Таблица 1. Динамика адгезии клеток клубеньковых бактерий к корневым проросткам бобовых растений, (млн клеток/см²)

Виды клубеньковых бактерий	Штаммы	Растение-хозяин	Количество адсорбированных клеток, N ₀			Количество клеток после десорбции, N			γF, %		
			Время выращивания культуры, час								
			24	48	72	24	48	72	24	48	72
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	5601	горох	740	940	720	350	560	350	47.3	59.5	48.6
	5609		390	720	290	170	420	130	43.5	58.3	44,8
<i>Rhizobium simplex</i>	5879	эспарцет	300	570	90	110	260	100	36.6	45.6	34.4
	5881		290	680	310	110	330	120	37.9	48.5	38.7
<i>Mezorhizobium ciceri</i>	6042	нут	140	190	100	45	70	30	32.1	36.8	30.0
	6050		160	200	120	60	81	40	37.5	40.5	33.3
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5789	соя	-	240	470	-	80	240	-	33.3	51.0
	5805		-	270	520	-	100	310	-	37.0	59.6

- не исследовались

Исходные суспензии содержали 3 млрд кл./мл

Так, у штамма 5601 оно составляет 47.3 и 48.6, у штамма 5609-43.5 и 44.8 % соответственно. Подобная закономерность отмечается и у штаммов из клубеньков эспарцета и нута, число адгезии которых равно: у суточной культуры штамма эспарцета 5879-36.6; у двухсуточной – 45.6, у трехсуточной – 34.4, у штамма 5881-37.9; 48.5; 38.7%, у штамма нута 6042-32.1; 36.8; 30.0, штамма 6050-37.5; 40.5; 33.3% соответственно.

В аналогичных условиях у медленно растущих клубеньковых бактерий свои высокие значения адгезии отмечаются при контакте проростков с трехсуточными культурами, так как у медленно растущих фаза максимального размножения приходится на 3-4-й день роста. У штамма 5789 число адгезии составляет 51,0 и у шт. 5805-59.6 %, тогда как у двухсуточной культуры $\square F$ равно 33.3 и 37.0%. При рассмотрении зависимости адгезии клеток клубеньковых бактерий от возраста культуры, замечено, что она достигает максимального значения в середине фазы развития.

Имеющиеся сведения о влиянии растительного сока на рост и размножение клубеньковых бактерий в литературе противоречивы. Существует мнение, что корни бобовых растений токсичны как для специфичных, так и неспецифичных штаммов [9]. Известно и противоположное суждение, согласно которому корни бобовых растений оказывают стимулирующее действие на рост клубеньковых бактерий соответствующего вида и указывают на наличие в корнях бобовых стимулирующих веществ [5,7]. Данные, представленные в табл. 2, показывают влияние корневого сока исследуемых бобовых на адгезию клубеньковых бактерий. Число адгезии, полученное из проростков с суспензией, приготовленной на корневом соке, превышает данные, полученные от контакта с водной суспензией. Так, например, заметная разница наблюдается у штаммов *Rh. japonicum* – 5789 и 5805, $\square F$ которых составляет – 52.2 и 59.6, а в водной суспензии – 46.8 и 52.5 %, соответственно. То же самое наблюдалось и у штаммов гороха 5601 и 5609, где адгезионное число составляет: в корневом соке – 63.2 и 58.7, а в водной суспензии – 61.5 и 56.6%, и у одного штамма эспарцета – 5879 – 49.1 и 47.1, и нута шт. 6042 – 39.2 и 37.5%, соответственно. Разница между двумя последними вариантами меньше по сравнению с *Rh. japonicum*, либо число адгезии у обоих вариантов одинаковое, как у штаммов эспарцета 5881– 50.0 и штамма нута 6050-42.3 %.

Таблица 2. Адгезия клубеньковых бактерий на проростках растения-хозяина при воздействии корневого сока, (млн клеток/см²)

Виды клубеньковых бактерий	Штаммы	Растение-хозяин	Количество адсорбированных клеток, N ₀		Количество клеток, оставшихся после десорбции, N		□ _F , %	
			суспензия					
			на корневом соке	водная	на корневом соке	водная	на корневом соке	водная
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	5601	горох	980	650	620	400	63.2	61.5
	5609		630	530	370	300	58.7	56.6
<i>Rhizobium simplex</i>	5879	эспарцет	610	700	300	330	49.1	47.1
	5881		800	700	400	350	50.0	50.0
<i>Mezorhizobium ciceri</i>	6042	нут	510	400	200	150	39.2	37.5
	6050		520	450	220	190	42.3	42.2
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5789	соя	440	470	230	220	52.2	46.8
	5805		520	400	310	210	59.6	52.5

Из данных табл. 2 следует, что корневой сок испытанных бобовых растений положительно влияет на адгезию специфичных клубеньковых бактерий.

Таким образом, в результате проведенных опытов выяснено, что способность клеток клубеньковых бактерий к адгезии определяется возрастом микроорганизма. Клубеньковые бактерии проявляют адгезионную способность преимущественно в экспоненциально растущей культуре. Полученные результаты показывают, что корневой сок стимулирует адгезию специфичных клубеньковых бактерий, что, очевидно, связано с наличием в корнях бобовых веществ, которые активизируют этот процесс.

Из наших предварительных данных, полученных из вегетационных опытов, следует, что штаммы с высокой адгезией способствуют проявлению активной азотфиксации и высокого урожая бобовых растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Մաթևոսյան Ֆ.Ս., Ստեփանյան Թ.Հ., Հարությունյան Ս.Հ., Ալեքսանյան Ն.Մ. Պաշարաբաղադրանքի ազդեցիկն ունակության մասին: ՀԳԱԱ Զեկույցներ, 3, 288-294, 2011:
2. Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. М., „ Наука”, 485 с., 1987.
3. Кудриш И.К., Бера З.Т., Гордиенко А.С., Дыренко Д.И. Влияние *Azotobacter vinelandii* на прорастание семян растений и адгезия этих бактерий к корням огурцов. Прикладная биохимия и микробиология, 44, 4, с. 442-447, 2008.
4. Лойко Н.Г., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В., Козлова А.Н., Гальченко В.Ф., Эль - Регистан Г.И. Покоящиеся формы *Sinorhizobium meliloti*. Микробиология, 80, 4, с. 465-476, 2011.
5. Նալբандյան Ա.Դ., Արությունյան Տ.Ա., Տեպանյան Կ.Մ., Նալբандյան Ն.Մ., Ալեքսանյան Փ.Տ. Օ սպեցիֆիկության կոմպոնենտները բոբիկի և ցորենի: Բիոլոգ. թերթ. Արմենիա, 49, 3-4, с.154-155, 1996.
6. Прянишников Д.Н. Азот в жизни растений и в земледелии СССР. Избранные сочинения, М., с. 520, 1945.
7. Dulce N. Rodriguez-Navarro, Marta S. Dardanelli & Jose E. Ruiz-Sainz. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. FEMS Microbiol. Lett., 272, p.127-136, 2007.
8. Fletcher M. Bacterial attachments in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. Bacterial adhesion (Molecular and ecological diversity). New York: Wiley-Liss. p.1-24, 1996.
9. Gage D.J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic Nitrogen Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiol. Mol. Rev., 68, p.280-300, 2004.
10. Kogure K., Ikemoto E., Morisaki H. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces in dependent on swimming speed. J. Bacteriol., 180, 4, p.932-937, 1998.
11. Novak K., Lisa L., Skredleva V. Rhizobial nod gene-inducing activity in pea nodule mutants: dissociation of nodulation and flavonoid response. Physiol. Plant, 120, p.546-555, 2004.
12. Robledo M., Rivera L., Jimenez-Zurdo J., Rivas R., Dazzo F., Velasquez E., Martinez-Molina E., Hirsch A., Mateos P. Role of *Rhizobium* CelC₂ in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots abiotic surfaces. Microbial Cell Factories, 11, 125, 2012.

Ստացվել է 21.11.2012