

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АССОЦИАЦИИ КАЛЛЮСНЫХ КУЛЬТУР БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

С. А. САРКИСЯН, А. Г. ГАЛСТЯН, М. Г. ШАМЦЯН,
Л. А. АГАДЖАНИАН, Ю. Г. ПОПОВ

Ереванский государственный университет,
кафедра физиологии и анатомии растений

Установлено, что проникновение клубеньковых бактерий в клетки каллюсных культур осуществляется с помощью образований, напоминающих межклеточные инфекционные нити.

Առանձնագրերի և բուսական և միկրոբային կոմպոնենտների սուբմիկրոսկոպիկ կառուցվածքը ուսումնասիրվել է ապոպլազմի արմատային ծաղում ունեցող կալլուսային հյուսվածքների և սպինդրիկ պրոտրաբակտերիաների ասոցիացիաներում:

Պրոտրաբակտերիաների ներթափանցումը կալլուսային հյուսվածք իրականացվում է պլազմային ժառանգման թելերի օգնությամբ:

Submicroscopic organization of plant and bacterial components of soy and alfalfa callus cultures originated from roots and associated with the specific strains of nodule bacteria was studied.

Penetrations of the nodule bacteria in the callus culture cells is realised by means of some formations similar to intercellular infectious threads.

Бактерии клубеньковые—каллюсная культура—инфекционная нить.

При изучении симбиотической азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий в условиях *in vitro* с успехом используются каллюсные культуры бобовых растений различного происхождения. Установлено, что в ассоциации каллюсных культур со специфичными штаммами клубеньковых бактерий азотфиксирующая активность значительно выше [4, 5, 8]. Она заметно снижается при использовании неспецифичных штаммов клубеньковых бактерий [6]. С этой точки зрения изучение ультраструктуры ассоциации каллюсных культур со специфичными штаммами клубеньковых бактерий представляет определенный научный интерес.

Целью данного исследования являлось изучение субмикроскопической организации как растительного, так и микробного компонентов ассоциации каллюсных культур сои и люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий.

Сделана попытка выявления проникновения клубеньковых бактерий в клетки каллюсных культур сои и люцерны.

Материал и методика. Исследования проводили на каллюсных культурах люцерны сорта Апаранская-40 и сои сорта Передовой корневого происхождения. Каллюсные ткани культивировали на средах Бутенко с соев. [2] и МБ-5 [3]. Бобово-ризобиальные ассоциации создавали на этих же средах с использованием *Rhizobium japonicum* шт. 132/61, 21/67 и *Rhizobium meliloti* шт. 646, 50/72, полученных из Института микробиологии АНА. Каллюсная ткань люцерны сорта Апаранская-40, ассоциированная со специфичными штаммами клубеньковых бакте-

рий, имеет светло-желтый цвет, полурыхлую, значительно ослабленную консистенцию, легко распадается на отдельные кусочки. Каллюсная ткань сои сорта Переловой в ассоциации с *Rh. japonicum* беловато-желтого цвета, также имеет полурыхлую консистенцию. Для электронномикроскопических исследований объект фиксировали глутаральдегидом и дифигировали 2%-ным раствором OsO_4 . После обезвоживания в растворах спиртов подходящей концентрации материал зашивали в смесь эпон и арайдита. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме марки «УМТН-4», контрастировали цитратом свинца по Рейнхарту [11] и изучали в электронном микроскопе марки «УЕМ-17» при инструментальном увеличении в 20000–40000 $\times$.

Результаты и обсуждение. На ультратонких срезах субмикроскопическая организация клеток ассоциированной ткани как сои, так и люцерны, значительно отличается от ультраструктуры клеток неассоциированного каллюса сои и люцерны (контроль). Так, клетки каллюсов контрольного варианта имеют продолговатую, реже округлую форму. Их цитоплазма занимает пристенное положение. Вакуоли довольно крупные. Матрикс цитоплазмы уплотненный, содержит в большом количестве осmioфильные гранулы высокой электрооптической плотности, представляющие собой рибосомы. Эндоплазматическая сеть представлена как гранулярной, так и агранулярной формами. Следует отметить, что элементы эндоплазматической сети в основном локализованы по периферии клетки, у цитоплазматической мембраны. В клетках каллюсов как сои, так и люцерны обнаружены многочисленные митохондрии, которые в основном имеют овальную или округлую форму с отчетливо выраженными кристами (рис. 1). На некоторых ультратонких срезах был вы-



Рис. 1. Фрагмент клетки каллюсной ткани сои. М—митохондрии, Р—рибосомы, Эс—эндоплазматическая сеть. Ув. 120000

явлен процесс деления митохондрий. Пластиды в довольно большом количестве представлены в виде амилопластов, которые содержат крупные гранулы крахмала (рис. 2). Зафиксированы отдельные моменты процесса деления пластид. Цитоплазма содержит также гра-

лулы липидов, которые расположены неравномерно. В клетках изученных каллюсов обнаружены диктиосомы (рис. 3).



Рис. 2. Фрагмент клетки каллюсной ткани люцерны. А—амилопласты, Я—ядро, Яд—ядрышко. Ув 85000.

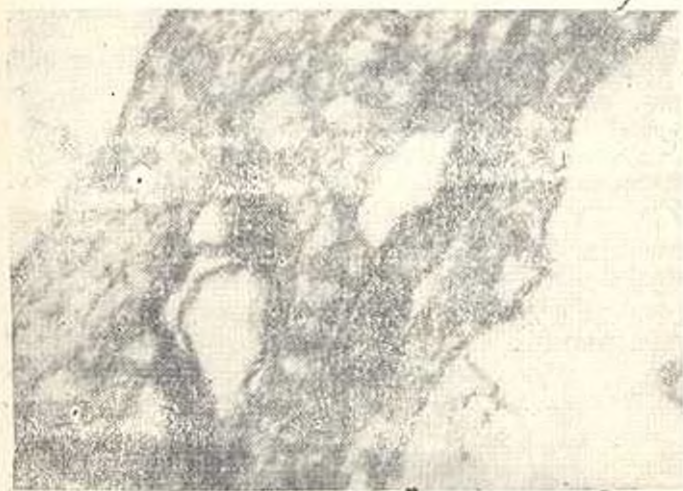


Рис. 3. Диктиосомы в клетке каллюсной ткани сои. Ув 110000.

Каллюсы как сои, так и люцерны содержали одно- и двухъядерные клетки, что подтвердилось также методами цитохимического анализа. Ядра чаще всего имеют продолговатую или неопределенную форму с отчетливо выраженной оболочкой. Последняя, трехслойная, состоит из двух осмиофильных и одного осмиофобного слоев. Выделяются поры оболочки ядра. Хроматин расположен неравномерно в виде скоплений (рис. 4).

Субмикроскопическая организация клеток ассоциации каллюсов сои и люцерны с *Rhizobium* имеет некоторые особенности. Так, в изученных ассоциациях клетки каллюсов достигают огромных раз-

меров. Вакуоли увеличены, в результате чего цитоплазма более узким слоем занимает пристенное положение. Резко изменена ультраструктура матрикса цитоплазмы клеток. Органеллы клетки с трудом выявляются, их количество значительно уменьшается. Рибосомальный аппарат слабо развит. Уменьшается количество рибосом.

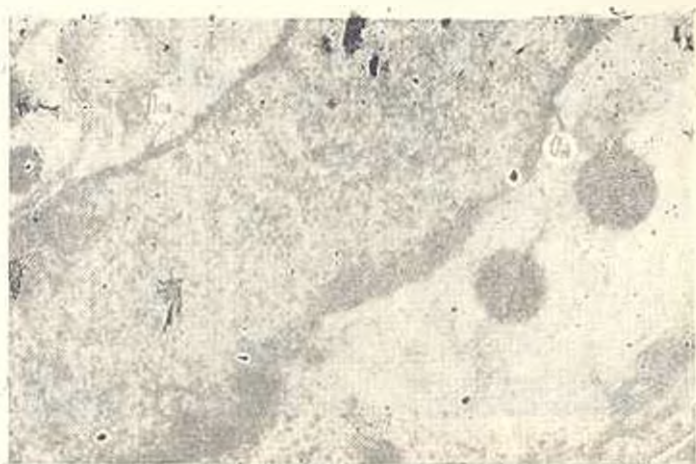


Рис. 4. Фрагмент ядра каллюзной ткани сои: Дя — оболочка ядра. Пяя — поры оболочки ядра. Ум 145000

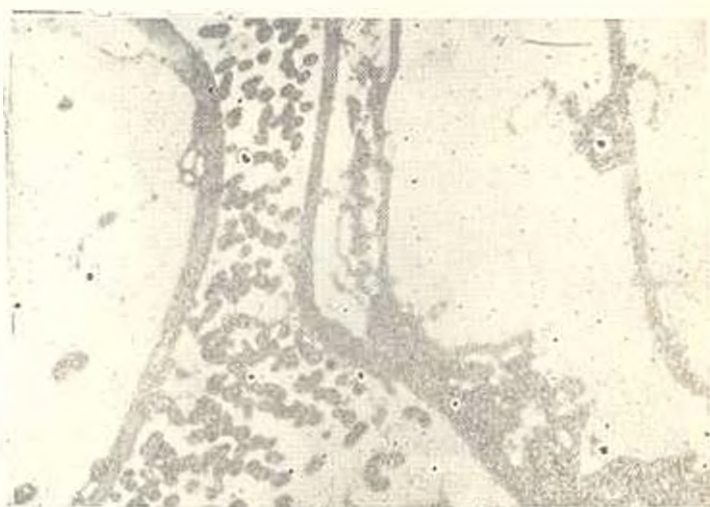


Рис. 5. Инфекционная нить в аксоплазме каллюзной ткани люцерны с клубеньковыми бактериями. Ум 145000

На ультратонких срезах были выявлены образования, напоминающие межклеточные инфекционные нити. Подобные инфекционные нити были обнаружены также при заражении зернового экссантата сои клубеньковыми бактериями [9]. Выявленные нами образования не имеют собственной оболочки. Их оболочка образуется при объединении отдельных фрагментов оболочек соседних клеток (рис. 5). Она значительно утолщена по сравнению с оболочками клеток из

росимбионта. Матрикс инфекционных нитей состоит из гомогенного компонента средней электроннооптической плотности. Однако были обнаружены также инфекционные нити, матрикс которых состоит из тонкофибриллярного компонента. Подобное строение инфекционной нити описано также Яковлевой [7] в опытах *in vivo* с инфицированным корневой системы бобовых растений клубеньковыми бактериями. В ассоциациях каляусов сои и люцерны с *Rhizobium* были выявлены клубеньковые бактерии, а также их бактеронды. Бактерии различной формы окружены трехслойной клеточной стенкой и трехслойной цитоплазматической мембраной, т. е. имеют строение типичных грамотрицательных бактерий. В них обнаружены вакуоли, содержание которых имеет низкую электроннооптическую плотность. Они, возможно, содержат запасные вещества липидной или полисахаридной природы. Подобная ультраструктура описана также у клубеньковых бактерий, находящихся в инфекционных нитях бобово-зобинальной ассоциации [3]. В инфекционных нитях и клетках изученных ассоциаций клубеньковые бактерии размножаются перетяжкой и почкованием (рис. 6).



Рис. 6. Пример почкования нитчатой бактерии в ассоциации нити. Ум. 120000.

Бактеронды, которые были обнаружены как в инфекционных нитях, так и в клетках ассоциации, отличаются по своей ультраструктуре от типичных бактерий. Они довольно крупные, имеют различную форму: продолговатую, овальную, округлую, неопределенную. Матрикс цитоплазмы у них значительно уплотненный, содержит большое количество осемифильных гранул, представляющих собой рибосомы. Обнаружены также гранулы липидов в виде включений типа волютина. Кроме того, в отличие от бактериальных форм в бактерондах обнаружены образования, которые имеют гомогенный матрикс средней электроннооптической плотности, аналогичный матриксу бактериальных спор. Описание образований по ультраструк-

туре сходны с артриспорами, которые образуются в бактериоидях [8].

Установлено, что клубеньковые бактерии, а также бактериоиды, находящиеся в инфекционных нитях, постепенно переходят в клетки каллюсных тканей сои и люцерны. Выход клубеньковых бактерий из инфекционных нитей и вход в цитоплазму клеток изученных каллюсов происходит путем, подобным пиноцитозу. Были зафиксированы отдельные моменты формирования пиноцитозных вакуолей.

Таким образом, выявлено сходство в ультраструктурах ассоциации в естественных условиях и ассоциативных культур бобовых растений со специфичными штаммами клубеньковых бактерий *in vitro*. Последние можно использовать как модель для изучения различных вопросов азотфиксации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р. Г., Гусев М. В., Киркин А. Ф., Корженевский Т. Г., Маркирова Г. Н. Клеточная инженерия, кн. 33, сер. Биотехнология, под ред. Егорова И. С., Самуилова В. Л. М., 52, 58, 1987.
2. Бутенко Р. Г., Холодова В. П., Урманцева В. А. Физиология растений, III, 5, 926—936, 1972.
3. Маршавина З. В., Саярук О. Г., Щербакова Е. Н., Томикин Э. С., Заргарян О. Н. Биол. ж. Армении, 26, 6, 13—18, 1973.
4. Машуртик Е. Н., Шильникова В. К. Клубеньковые бактерии и симбиотический процесс. М., 1973.
5. Ничик М. М. Физиол. и биохим. культ. растений, 14, 2, 143—147, 1982.
6. Ничик М. М. Тез. докл. IV Всес. конф. 179, Кишинев, 1983.
7. Шильникова В. К., Бонарцева Г. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 151—154, 1971.
8. Ежова Л. З. М. Бактериоиды клубеньковых бактерий. М., 1975.
9. Daddarwal K. R., Prabha Shashi, Tazro P. Curr. Sci. (India), 48, 14, 647—649, 1979.
10. Holsten R. D., Burns R. C., Hardy R. W. F., Hebert R. R. Nature, 232, 5307, 173, 1971.
11. Reynolds R. S. cell bio., 17, 208—212, 1976.

Поступило 21 III 1991 г.