

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* С РАСТЕНИЯМИ КАРТОФЕЛЯ, КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ *IN VITRO*

Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур А.Е.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

Бактерии рода Azospirillum, интродуцированные в зону корней картофеля в культуре in vitro, вызывают интенсивное развитие растений. На корнях растений образуются псевдо клубеньки, не проявляющие нитрогеназной активности. Азоспириллы развиваются в клетках и межклетниках паренхимной ткани клубеньков. При этом бактериальные клетки находятся в виде цист или симбиосом, характерных для бобово-ризобияльных симбиозов.

Ключевые слова: азоспириллы, картофель, псевдо клубеньки

Взаимоотношения бактерий рода *Azospirillum* с растениями изучают во многих научных центрах. Одним из итогов этих исследований является положение о том, что взаимодействие “*Azospirillum* – корни растений” не выражено морфологически, однако при этом существует очень тесная пространственная и функциональная связь бактерий с рядом видов растений. По нашим наблюдениям, среди видов растений, у которых исследовали реакцию на интродукцию данных бактерий в корневую зону, определёнными особенностями отличается картофель. Результаты изучения отдельных элементов взаимоотношений азоспирилл с растениями картофеля положены в основу настоящего сообщения.

Материалы и методы. Реакцию картофеля (*Solanum tuberosum L.*) на бактеризацию азоспириллами изучали в культуре *in vitro*. опыты проводили в люминостате при интенсивности освещения 20 тыс. люкс с фотопериодом 16 час. и температуре 26±2°C. Меристемные растения картофеля сорта Луговской выращивали в стерильных условиях на слабоагаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга в соответствии с методическими рекомендациями [1]. Через неделю после высаживания черенков на питательную среду (в фазе начала укоренения) в пробирки вносили по 0,1 мл суспензии бактерий рода *Azospirillum* (около 100 тыс. клеток), выращенных на жидкой среде BMS [2] в условиях

периодической культуры.

Использовали три штамма азоспирилл, выделенные нами ранее из корней райграса пастбищного (*Lolium perenne* L): *A. brasilense* шт. 410 и *A. lipoferum* шт. 4014, депонированные в коллекции микроорганизмов ВНИИСХМ и в коллекции Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, а также *A. lipoferum* шт. ЛС-3 из лабораторной коллекции.

По истечении 30 дней выращивания растений определяли нитрогеназную активность бактерий в корневой зоне. Для этого ватные пробки в пробирках заменяли резиновыми, вводили ацетилен в количестве 10% объёма воздуха в пробирке и через один час определяли активность ацетиленредукции на газовом хроматографе “Chrom-4”.

После определения нитрогеназной активности изучали взаимодействие микро-, и макроорганизмов на клеточном уровне методом электронной микроскопии ультратонких срезов корневой системы растений. Заливали образцы в ЭПОН-812. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме BS 490-A “Tesla” и просматривали в электронном микроскопе BS 540 “Tesla”.

Результаты и их обсуждение. Бактериальная суспензия, внесенная в пробирки с микрочеренками картофеля, вызвала интенсивное развитие растений. Через две недели выращивания в люминостате бактеризованные растения превышали по высоте контрольные в 1,5-2 раза (табл.).

Окраска листьев инокулированных растений оставалась интенсивно-зелёной до окончания эксперимента, в отличие от контрольных, края листьев которых к этому времени начинали желтеть. Отмечено усиленное развитие корневой системы экспериментальных растений: размеры и масса их корней превышали контрольные показатели в 2,1 – 2,5 раза (см. табл.).

Отличительной особенностью инокулированных растений является также формирование клубенькоподобных образований на корнях. Образование клубеньков индуцировалось всеми штаммами азоспирилл, независимо от их видовых особенностей.

В литературе описано явление паранодуляции – образование псевдоклубеньков (*p*-клубеньков) при обработке небобовых растений определёнными индукторами (чаще 2,4-дихлорфенок-сиуксусной кислотой, действующей в невысоких концентрациях как ауксин) и параллельной инокуляции культурами diaзотрофов

[3-5]. Образование *p*-клубеньков на корнях картофеля не описано.

Влияние бактеризации на развитие растений картофеля сорта Луговской в культуре in vitro

Варианты	Высота растений, см	Масса абс. сухих стеблей и листьев, мг на 1 пробирку	Масса абс. сухих корней, мг на 1 пробирку
1	2	3	4
Контроль	5,3	24,4	9,1
<i>A. lipoferum 4014</i>	10,7	46,3	23,7
<i>A. lipoferum ЛС-3</i>	8,1	35,1	19,5
<i>A. brasilense 410</i>	10,1	43,0	25,3
НСР05	2,2	8,5	5,1

Проведенные нами цитологические исследования тканей псевдоклубеньков позволили установить, что данные образования являются, в основном, следствием увеличения размеров клеток, а не усиления их деления. Эти изменения можно наблюдать в световом микроскопе при 150-кратном увеличении.

Электронномикроскопические исследования ультратонких срезов клубеньков показали, что местом локализации клеток азоспирилл являются межклетники, а также живые растительные клетки.

Изучение ультратонких срезов клубеньковой ткани в поперечном сечении клубеньков демонстрирует инфицирование бактериями в основном периферийных тканей.

Характерной особенностью клеток азоспирилл, населяющих клубеньки, является то, что они находятся в цистообразной форме, сходной с симбиосомами, характерными для бобово-ризобияльного симбиоза (рис.1 и 2).

На представленных рисунках отчетливо просматривается осмиофобное пространство, достигающее 0,1 мкм, по внешнему виду напоминающее перибактероидное пространство вокруг бактериоидов в клубеньках отдельных видов бобовых растений (например, люпина), и осмиофильная оболочка, окружающая бактериальную клетку вместе с участками осмиофобного пространства, что характерно для симбиосом. На основании только морфологических исследований нельзя с уверенностью сказать, цисты это или симбиосомы. Не ясно также, почему

азоспириллы локализованы в клубеньках, особенно если учесть, что микроаэрофильные условия для них созданы непосредственно в слабоагаризованной среде для выращивания меристемных растений. Очевидно, первостепенное значение в этом имеет энергоснабжение и обеспечение углеродом, ассимилированным растением в ходе процесса фотосинтеза.

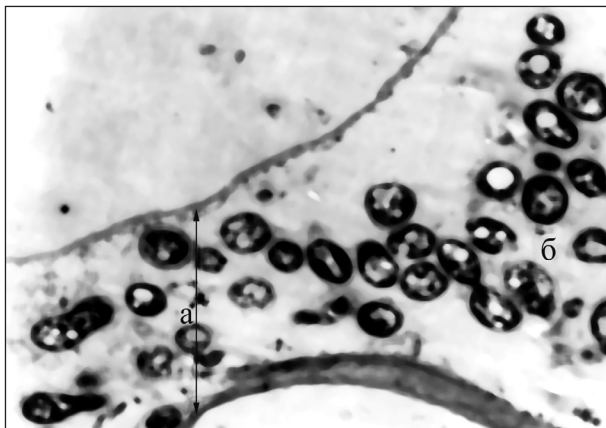


Рис.1. Ультратонкий срез периферийной части р-клубенька (бактерии локализованы в межклеточном пространстве) а – растительная клеточная стенка; б – бактерии x 5000

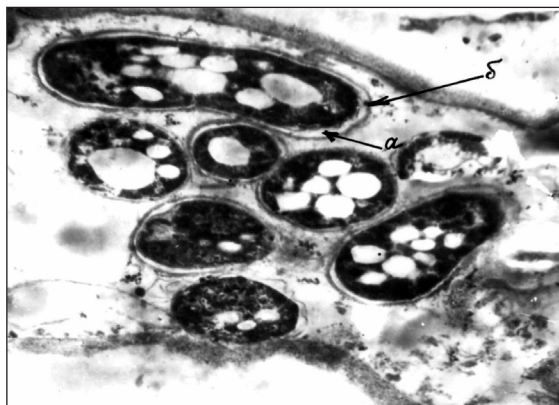


Рис.2. Бактериальные клетки в межклетнике р-клубенька а – осьмиофобное пространство; б – осьмиофильная оболочка x 15000

Как известно, ассоциативные связи азоспирилл с корнями ряда видов растений характеризуются высокой азотфиксирующей активностью. Однако в наших опытах нитрогеназная активность бактерий в корневой зоне растений не выявлена. Это вполне объяснимо, если учесть, что количество азота, вносимого в питательную среду Мурасиго-Скуге в соответствии с ее составом, заведомо избыточно и полностью растениями не используется. При этом избыточное содержание минерального азота будет ингибировать синтез азотфиксирующего ферментного комплекса. В связи с этим можно говорить об особой форме взаимосвязи азоспирилл с растениями картофеля, которая не затрагивает функционирование нитрогеназы. Первостепенное значение при этом, вероятно, имеют бактериальные стимуляторы роста (или иные биологически активные вещества), обеспечивающие растению комфортное существование *in vitro*. Об этом может свидетельствовать как усиленное корнеобразование и развитие стеблей, так и интенсивность окраски, а также поддержание растения в жизнеспособном состоянии длительное время. Очевидно, в данном случае можно говорить, что взаимоотношения между азоспириллами и растениями картофеля имеют гормонально-энергетический характер.

В связи с этим уместно напомнить, что ряд исследователей считает основной функцией азоспирилл в условиях ассоциативного симбиоза не фиксацию атмосферного азота, а продуцирование ростстимулирующих веществ. Показательны в этом опыты И. Башана и соавт. [6] с бактериризацией спираллами растений томатов. Авторы отмечают усиленный рост бактеризованных растений, а также отсутствие азотфиксации в корневой зоне, и на основании полученных результатов делают вывод о продуцировании гормонов роста как главной функции изучаемых бактерий. На наш взгляд, такая трактовка всё же односторонняя. Если основываться только на результатах вышеописанных опытов с картофелем, то напрашивается вывод, аналогичный сделанному вышеупомянутыми авторами. Однако, изучавшиеся в опытах штаммы азоспирилл активно фиксируют атмосферный азот в чистой культуре, а представители *A. lipoferum* шт.4014 и ЛС-3 способны образовывать с корнями райграсса пастбищного тесные ассоциации, отличающиеся высокой азотфиксирующей активностью [7]. Следовательно, не отрицая значения азоспирилл как продуцентов

фитогормонов, можно говорить либо о доминировании той или иной функции бактерий в зависимости от экологической ситуации, либо о специфичности взаимодействия бактерий с различными видами растений.

Таким образом, при интродукции азоспирилл в зону корней картофеля в культуре *in vitro* формируется эндосимбиотическая связь на клеточном уровне между корнями картофеля и бактериями, что проявляется морфологически, цитологически и физиологически. Полученные результаты служат не только иллюстрацией полифункциональности воздействия бактерий рода *Azospirillum* на растение. Они интересны и с практической точки зрения: отработка в деталях способа выращивания бактеризованных меристемных растений позволит обеспечить ускоренное размножение сорта и, надо полагать, лучшее укоренение и развитие растений при высадке их в почву. При этом полученные растения картофеля могут иметь повышенную устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам, поскольку они подготовлены к высадке в почву не в асептических условиях, как это предусматривает технология микроклонального размножения, а в условиях взаимодействия с полезными бактериями. Перспективы использования полезной микрофлоры в технологиях размножения растений вполне реальны, если исходить из логики «заполнения ниши» для микроорганизмов до высадки в агрессивную для ювенильных растений природную среду обитания.

1. Технология производства исходного безвирусного материала картофеля методом культуры меристемы для первичного семеноводства в УССР / Методические рекомендации. – Немешаево, 1975. – 8 с.

2. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт, Р.Г.И. Мюррей, Р.Н. Костилоу и др.; Пер. с англ. под ред. Кондратьевой Е.А., Калакуцкого Л.В. – М.: Мир, 1984. – Т.3. – 264 с.

3. Глаголева О.Б., Ковальская Н.Ю., Киреев И.И. и др. Паранодуляция рапса при инокуляции азот-фиксирующими ризосферными бактериями // Микробиология. – 1997. – Т.66, № 4. – С.545-552.

4. Chen W., Xie Y., Chen T. Studies on para-nodulation of wheat and nitrogen fixation // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications / Ed. I.A. Tikhonovich. – Kluwer Academic Publisher,

1995. - P.782.

5. Tchan Y.T., Kennedy I.R. Possible N₂ – fixing root nodules induced in non-legumes // Agric. Sci. (AIAS, Melbourne). – 1989. – №2. – P.57 – 59.

6. Bashan Y., Singh M., Levanony H. Contribution of Azospirillum brasilense Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation // Can. J. Bot. – 1989. – Vol.67, №8. – С.2429 - 2434.

7. Волкогон В.В., Хальчицкий А.Е., Миняйло В.Г. и др. Азотфиксирующие микроорганизмы корневой зоны райграса пастбищного и костреца безостого // Микробиол. журн. – 1991. – Т.53, №6. – С.3-8.

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОВІДНОСИН БАКТЕРІЙ РОДУ *AZOSPIRILLUM* З РОСЛИНАМИ КАРТОПЛІ, ЯКІ КУЛЬТИВУЮТЬСЯ *IN VITRO*

Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур О.Є.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

Бактерії роду Azospirillum, інтродуковані в зону коренів картоплі в культурі in vitro, викликають інтенсивний розвиток рослин. На коренях утворюються псевдобульбочки, які не проявляють нітрогеназної активності. Азоспірили розвиваються в клітинах і міжклітинниках паренхимної тканини бульбочок. При цьому бактеріальні клітини знаходяться у вигляді цист або симбіосом, характерних для бобово-ризобіальних симбіозів.

Ключові слова: азоспірили, картопля, псевдобульбочки.

INTERACTION PECULIARITIES OF *AZOSPIRILLUM* GENUS BACTERIA WITH CULTIVATED *IN VITRO* POTATO PLANTS

Volkogon V.V., Dimova S.B., Mamchur O.E.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

Bacteria of Azospirillum genus, introduced into root zone of cultivated in vitro potato plants, cause the intensive plant development. Paranodules, observed on roots, do not reveal the nitrogenase activity. Azospirillum bacteria have been developed in cells and intercellular space of the nodule parenchyma. Bacterial cells are as cysts and symbiosoms, typical for the legume-rhizobial symbiosis.

Key words: Azospirillum bacteria, paranodules, potato plant in vitro