

УДК 633.31:576.851.155:631.413.3

РЕАКЦИЯ ШТАММОВ *RHIZOBIUM MELILOTI* НА РАЗНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИСТОГО НАТРИЯ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Г. Ф. ХАЙЛОВА, Р. Р. КАМАР, Т. П. ЛАРЬКОВА, В. К. ШИЛЬНИКОВА,
Б. П. СТРОГОНОВ

(Кафедра микробиологии ТСХА, Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева АН СССР)

В настоящее время все большие площади засоленных земель вовлекаются в сельскохозяйственное производство. Значительная часть их отводится под бобовые. Многолетние бобовые травы и, как правило, люцерна, используются на засоленных землях в различных севооборотах. В этой связи возникает вопрос, можно ли выращивать бобовые на таких землях без внесения дефицитных и дорогостоящих азотных удобрений, учитывая способность данных растений к симбиозу с азотфиксирующими бактериями рода *Rhizobium*.

Однако несмотря на обширную информацию о солеустойчивости ряда видов бобовых растений, данных о влиянии соли на симбиотическую систему — ее формирование и функционирование — очень мало и в основном они касаются действия NaCl — соли, наиболее часто вызывающей засоление почв. Как правило, NaCl подавляет образование клубеньков на корнях бобовых растений. Это может быть обусловлено как особенностями реакции растения-хозяина на засоление, так и чувствительностью к нему клубеньковых бактерий. Виды бобовых различаются по степени чувствительности клубеньков в процессе их формирования к соли. Так, у маша (золотистая фасоль) клубеньки, образующиеся на корнях, весьма чувствительны к засолению. Уже при 10 мМ NaCl в среде число клубеньков на корнях маша заметно снижается [4]. Относительно влияния NaCl на образование клубеньков у вигны, которая культивируется в тех же зонах, что и маш, но отличается большей солеустойчивостью, данные противоречивы. По мнению одних исследователей [2, 4], клубеньки у вигны в процессе формирования характеризуются значительной солеустойчивостью. Отмечается также [4], что при засолении 0,75 мМ NaCl число клубеньков было близким к контролю и только при 10 мМ NaCl образование клубеньков начинало подавляться. Другие авторы [3] указывают на чувствительность клубеньков у вигны к засолению среды.

Противоречивые данные получены и в опытах с люцерной. Так, соль, сдерживая рост люцерны, практически не влияла на образование клубеньков [3]. Наряду с этим сообщается о большой чувствительности клубеньков у люцерны в период их формирования к засолению [7].

Устойчивость того или иного вида растений к засолению не всегда коррелирует с их способностью к симбиозу с клубеньковыми бактериями. Так, между солеустойчивым сортом *Glycine wightii* и клубеньковым бактериями в условиях засоления симбиоз затруднен [8]. Если растение-хозяин устойчив к засолению, определяющим фактором в процессе образования клубеньков является чувствительность клубеньковых бактерий к соли. О характере роста чистых культур клубеньковых бактерий при засолении имеются лишь единичные сведения, касающиеся преимущественно действия соли на *Rhizobium* тех видов, чьи растения-хозяева возделываются на засоленных почвах. Концентрации соли, которые выдерживают чистые культуры различных видов *Rhizobium*, колеблются в широких пределах. Так, рост клубеньковых бактерий вигны и сои почти полностью прекращается при наличии в питательной среде 0,75 мМ NaCl [4], а клубеньковых бактерий люцерны *Rh. meliloti* — до 3% [7].

В другой работе с чистой культурой *Rh. meliloti* штамм, выносящий 600 мМ соли, рассматривается как факультативный галотолерантный [6], т. е. устойчивость штамма к высоким концентрациям соли (2,4—3,6%) расценивается как его характерная особенность. Не исключено, что такая высокая устойчивость *Rh. meliloti* к засолению — отличительная особенность данного вида клубеньковых бактерий. Однако эти исследования выполнены на суспензионных культурах, что исключает возможность контроля числа клеток, способных к прорастанию в присутствии высоких концентраций соли. Возможно, что при высоких концентрациях соли селективируются солеустой-

Т а б л и ц а 1

Число проросших клеток разных штаммов клубеньковых бактерий люцерны на 3-й день культивирования (среднее из 20 определений)

Концентрация NaCl в среде, %	Штамм				
	422а	425а	441а	450а	434
Контроль (без NaCl)	253	155	631	545	274
0,25	227	133	640	424	283
0,5	175	89	643	404	213
1,0	153	82	640	466	205
2,0	106	68	580	188	129

чивые клетки, в результате пролиферации которых и наблюдается прирост бактериальной массы.

Более точные данные о действии соли на рост клеток *Rhizobium* можно получить, изучая их рост на плотных средах.

Задачей настоящей работы являлось сравнительное изучение роста штаммов *Rh. meliloti*, различающихся по степени вирулентности, на агаризованной среде, содержащей разное количество соли.

Материалы и методы

Культура *Rh. meliloti* (штаммы 422а, 425а, 441а, 450а и 434) получена из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии (г. Пушкин). Первые 4 штамма вирулентные, штамм 434 — неvirulentный. Культуры *Rhizobium* выращивали в чашках Петри на среде Ковровцевой [1], содержащей 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 и 3,0 % NaCl. Контроль — среда без соли. В чашки Петри высевали по 0,1 мл суспензии трехдневных культур испытуемых штаммов, разведение 10^{-6} , повторность 3—5-кратная, инкубация при 27°. Подсчет числа проросших клеток *Rhizobium* (число колоний) и измерение диаметра колоний проводили через 3 дня. Диаметр колоний измеряли гибкой линейкой через крышку чашки Петри с помощью лупы 3X. В каждой чашке измеряли по 1 % колоний, т. е. в каждом варианте — по 30—50 колоний изучаемых штаммов. Численность и диаметр колоний на всей поверхности чашек определяли ежедневно до прекращения их роста. В каждом варианте измерено 90—150 колоний. Последствия соли на способность штаммов *Rh. me-*

liloti образовывать клубеньки изучали, инокулируя семена люцерны синей сорта Аз НИХИ 262. Семена люцерны урожая 1978 г. получены из Института хлопководства АН АзССР (г. Кировабад).

Для стерилизации семян использовали концентрированную H_2SO_4 , затем их многократно промывали стерильной дистиллированной водой и проросшие семена инокулировали суспензией 3-дневной культуры каждого из штаммов, предварительно выращиваемых на среде с 3,0 % NaCl. Контролем служили растения, инокулированные бактериями, которые выращивались на среде без соли, и неинокулированные растения. Выращивали растения (по 12 шт. в каждом варианте) в условиях асептики в пробирках с агаризованной безазотной средой Ли [5] в течение 4 недель при 25°, относительной влажности воздуха 70 % и освещенности 12—14 тыс. лк.

Результаты и их обсуждение

Число проросших клеток *Rh. meliloti* на контрольной среде (без NaCl) колебалось в зависимости от штамма в пределах 155—630 на чашку (табл. 1).

У всех штаммов на солевых фонах 0,25—2 %, как и в контроле, колонии появились на 3-й день инкубации. Штаммы различались по реакции на соль. У штаммов 422а и 425а даже на среде с 0,25 % соли и по мере повышения концентрации соли до 2 % число колоний снизилось. У штамма 450а количество клеток, образовавших колонии на среде с 0,25 % соли, значительно уменьшилось при повышении концентраций до 0,5, число колоний мало изменилось, а при концентрации 2 % число проросших клеток резко снизилось.

У штамма 441а при содержании соли в среде от 0,25 до 1 % число колоний практически не менялось по сравнению с контролем и только при 2 % соли число проросших клеток составило 80 % к контролю. Данные этого опыта показывают, что каждому штамму свойственны индивидуальные признаки, связанные, очевидно, с их биологическими и экологическими особенностями. Определенный консерватизм физиологических особенностей штамма как вида проявляется лишь в общей тенденции к усилению ингибирующего эффекта соли в зависимости от дозы.

Влияние соли проявлялось не только в снижении числа колоний, но и в подавлении скорости размножения клеток, о чем свидетельствуют данные о постоянном

Т а б л и ц а 2

Диаметр 3-дневных колоний клубеньковых бактерий люцерны (мм) на средах с NaCl

Концентрация NaCl в среде, %	Штамм				
	422а	425а	441а	450а	434
Контроль (без NaCl)	1,75±0,06	2,90±0,09	1,80±0,05	2,10±0,07	3,90±0,02
0,25	1,35±0,05	2,20±0,04	1,50±0,05	2,00±0,06	3,00±0,06
0,5	1,25±0,07	2,00±0,05	1,50±0,05	1,90±0,09	2,50±0,04
1,0	0,91±0,06	1,60±0,06	1,10±0,04	1,60±0,08	2,00±0,03
2,0	0,3±0,04	1,30±0,05	1,00±0,05	1,20±0,08	1,30±0,04

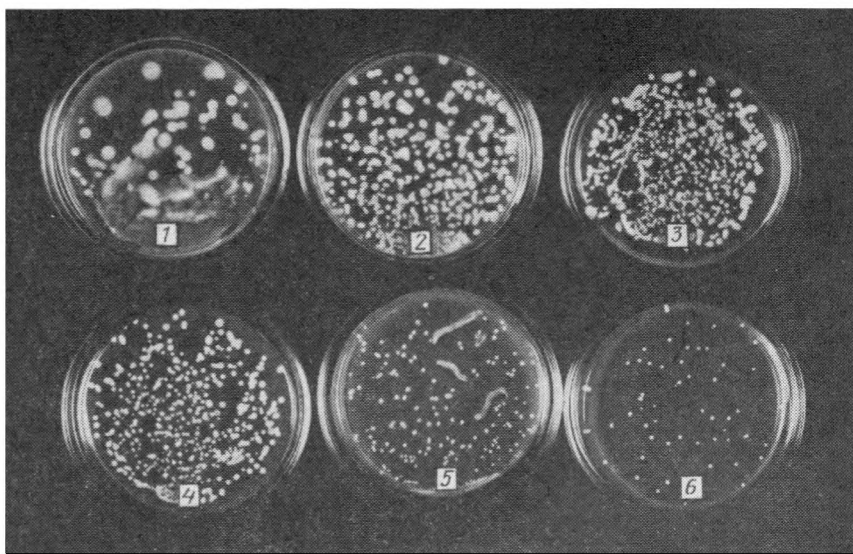
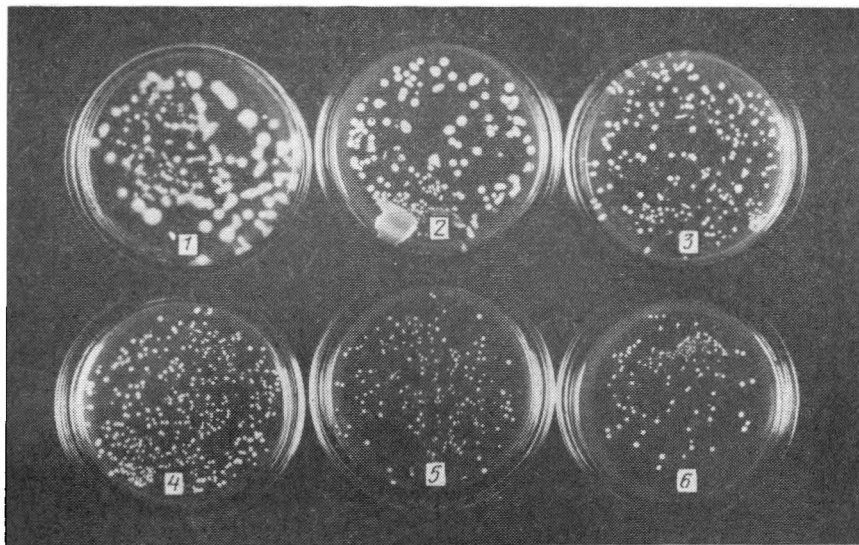


Рис. 1. Рост колоний вирулентного штамма 425а (вверху) и невирулентного штамма 434 на среде с различной концентрацией NaCl.

1 — контроль; 2 — 0,25 %; 3 — 0,50; 4 — 1,0; 5 — 2,0; 6 — 3,0 %.

уменьшению размера колоний при увеличении концентрации соли в среде (табл. 2, рис. 1). Степень ингибирования скорости размножения клеток (табл. 2) коррелировала со степенью ингибирования их прорастания (табл. 1), возрастая с 0,25 до 1 % соли в среде и достигая максимума при дозе 2 %. При длительном культивировании штаммов на солевых средах постепенно исчезают различия в размере колоний на различных солевых фонах и на контрольной среде (табл. 3). Более того, при увеличении срока инкубирования начинают прорастать клетки *Rhizobium* на среде с 3 % NaCl, которая была для них летальной (табл. 1 и 2). Очевидно, клетки адаптировались к этой дозе соли после длительного лаг-периода, продолжительность которого у различных штаммов неодинаковая. У штамма 434 он наиболее продолжительный (табл. 3).

Размеры колоний, появившихся на среде с 3 % NaCl, возрастали по мере увеличения периода инкубации. Однако при такой концентрации соли выживают далеко не все клетки *Rhizobium*. Так, на средах с 2 и 3 % соли (в среднем из 5 повторностей) количество проросших клеток у штамма 422а составило 582 и 350 против 681 в контроле; у 425а — 150, 142 и 254; 441а — 505, 463 и 966; 450а — 169, 65,8 и 503; у штамма 434 — 142, 86 и 568. Способность к прорастанию в этом случае сохраняют в зависимости от штамма лишь 15—50 % клеток. Штамм 441а обладает наиболее высокой солеустойчивостью, о чем можно судить по скорости размножения клеток, а также по их выживаемости на среде с 3 % соли.

Итак, наши данные о характере роста *Rh. meliloti* на солевой среде свидетельствуют о том, что устойчивость к засолению

Размер колоний штаммов *Rh. meliloti* при длительном культивировании их на средах с разной концентрацией NaCl (среднее из 90—50 измерений)

Срок культивирования, дни	Концентрация NaCl в среде, %											
	0	0,25	0,5	1,0	2,0	3,0	0	0,25	0,5	1,0	2,0	3,0
Штамм 450а						Штамм 434						
3	2,13	2,17	2,22	1,64	1,13	—	3,15	2,91	2,45	1,84	0,9	—
4	2,17	2,81	2,63	1,76	1,09	0,6	3,24	3,07	3,15	2,66	1,51	—
5	2,50	1,97	1,66	2,13	2,12	1,39	3,08	2,86	2,35	1,88	1,36	—
6	2,84	2,39	2,20	1,80	1,41	1,02	4,28	3,2	3,01	2,5	1,78	0,55
7	2,95	2,70	2,34	1,81	1,71	1,51	5,08	3,85	3,1	2,54	1,83	0,79
8	3,10	2,93	2,73	2,39	2,06	1,93	5,33	4,3	3,94	3,10	2,21	1,25
11	3,15	2,89	2,76	2,42	2,28	1,82	5,46	4,4	3,91	3,55	2,45	2,23
12	3,22	2,95	2,52	2,62	2,46	1,99	7,10	5,50	4,9	4,06	2,83	2,22
13	3,42	3,05	2,77	2,80	2,42	1,99	6,86	5,78	5,40	3,60	2,95	2,49
15	3,72	3,30	2,88	3,14	2,68	2,06	7,51	5,95	5,74	4,08	3,08	2,55
Штамм 441 а						Штамм 422а						
3	1,0	1,01	0,98	0,82	0,50	—	1,31	0,97	0,67	0,55	0,20	—
6	2,48	2,47	2,01	1,51	1,07	0,66	2,46	1,97	1,80	1,41	0,98	0,50
7	2,62	2,42	2,20	1,77	1,39	0,76	2,62	2,22	2,13	1,66	1,11	0,64
9	3,32	2,88	2,13	1,92	1,72	1,08	2,71	2,46	2,08	1,85	1,31	0,92
10	3,39	2,97	2,26	1,98	1,79	1,08	2,80	2,50	2,13	1,95	1,56	1,13
13	3,50	3,01	2,36	2,06	1,80	1,17	2,88	2,61	2,16	2,03	1,66	1,35

является особенностью указанного вида клубеньковых бактерий. Это согласуется с результатами исследований, полученными С. Рао [7]. Закономерности роста на засоленной питательной среде у неvirulentного штамма 434 такие же, что и у virulentных активных штаммов. Надо полагать, что устойчивость к засолению и способность к инфицированию растения-хозяина у клубеньковых бактерий люцерны не взаимосвязаны.

Под действием соли, очевидно, снижается скорость деления клеток *Rhizobium*. На рис. 2 показана зависимость между скоростью роста клубеньковых бактерий штамма 425а и содержанием соли в среде. По мере увеличения концентрации соли размер колоний, появившихся на 3-й день инкубации, уменьшается. В варианте с 3% соли колонии в этот день не были обнаружены. При увеличении срока культивирования колонии в конечном итоге достигают размеров, характерных для них при росте на незасоленной среде на 3-й день культуры. При концентрации 0,25% NaCl это происходит на 4-е сутки, при 0,5% — на 6-е, а при 3% — на 11-й день. Аналогичные особенности роста на средах, различающихся по содержанию соли, свойственны и другим штаммам.

Поскольку *Rhizobium* способны к размножению в условиях засоления, очевидно, они могут накапливаться в засоленных почвах в местах культивирования люцерны. Если это так, то значительное снижение интенсивности процесса образования клубеньков на корнях люцерны может быть обусловлено как особенностями физиологии растения-хозяина, растущего на засоленной почве, так и потерей клубеньковыми бактериями способности индуцировать клубеньки.

Бактерии активных штаммов, перенесшие солевой стресс (выращивание на среде с 3% соли), сохранили способность образо-

вывать клубеньки, активно фиксирующие азот (данные не приводятся). Растения выращивали на безазотной питательной среде, т. е. единственным источником азота для них служил азот, фиксированный *Rhizobium* в клубеньках. Растения, способные к симбиозу с бактериями, перенесшими солевой стресс, развивались даже несколько лучше, чем растения, инокулированные бактериями, которые выращивались на обычной среде. У неинокулированных растений, использовавших запасы азота в семенах, едва образовывался настоящий лист, тогда как у растений этого же возраста инокулированных *Rhizobium*, выросшими на среде с солью, было 5—7 настоящих листьев.

Штамм 434 неспособен образовывать клубеньки, что подтвердилось при его выращивании на среде без соли в нашем опыте. После выращивания на среде с 3% соли у 2 растений из 12 начали интенсивно образовываться клубеньки. Если у 4-недельных растений, инокулированных активными штаммами, образовалось по 1—2 клубенька,

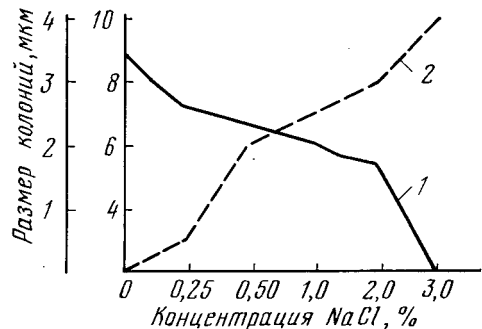


Рис. 2. Скорость роста штамма 425а на среде с различной концентрацией NaCl. 1 — размер колоний; 2 — время, сут.

то на растениях, инокулированных неvirulentным штаммом 434, — 4—5 более крупных клубеньков. Однако клубеньки, образованные штаммом 434, обладали очень слабой азотфиксирующей способностью, что отрицательно сказалось на развитии растений, сформировавших такие клубеньки. По своему развитию эти растения мало отличались от неинокулированных, не имевших клубеньков. В обоих случаях растения были бледно-зеленые, с очень мелкими листьями.

Итак, исследуемые штаммы отличаются друг от друга по степени солеустойчивости. Штамм 441а наиболее солеустойчив. Однако и чувствительные к засолению штаммы 422а и 425а способны выживать при наличии 3 % NaCl в питательной среде. Штаммы, выросшие на высоком солевом фоне (3 %), сохраняют способность к инокуляции растения-хозяина и к фиксации атмосферного азота.

На основании наших данных и результатов, полученных в опытах с другими штаммами *Rh. meliloti* [7], можно предположить,

что устойчивость к засолению среды свойственна этому виду клубеньковых бактерий.

Выводы

1. На среде с 1—2 % NaCl число клеток, образующих колонии (способных к делению), близко к контролю, ниже лишь скорость их пролиферации.

2. Клетки *Rh. meliloti* способны к адаптации, что подтверждается образованием колоний на среде с 3 % соли после длительного лаг-периода.

3. Солевой стресс (однократное пассирование на среде с 3 % соли) не приводит к снижению вирулентности штаммов.

4. По реакции на засоление среды не установлено различий между неvirulentным штаммом 434 и virulentными штаммами.

5. Можно предположить, что отрицательное действие NaCl на клубеньковые бактерии не столь глубоко, чтобы вызвать резкое подавление процесса формирования клубеньков в условиях хлоридного засоления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковровцева С. А. Влияние типа почвы и влажности на рост и размножение клубеньковых бактерий. — Тр. ВНИИ с.-х. микробиол., 1933, т. 5, с. 98—104. — 2. Valasubramanian V., Sinha S. K. — *Physiol. Plant.*, 1976, vol. 36, N 2, p. 197—200. — 3. Berstein, Ogata. — *Agron. J.*, 1966, vol. 58, p. 201—203. — 4. Huq S. M. J., Larher F. — *Zeitschrift Pflanzenphysiol.*, 1983, vol. 112, N 1, p. 79—87. —

5. Lie T. A. — *Plant a., Soil*, 1969, vol. 30, N 3, p. 391. — 6. Souvage D., Hamelin., Larher F. — *Plant Sci. Letter*, 1983, vol. 31, N 1—2, p. 291—302. — 7. Subba Rao. — *Indian J. Agricult. Sci.*, 1972, vol. 42, p. 384—386. — 8. Wilson J. R. — *Austr. J. Agricult. Res.*, 1970, vol. 21, N 4, p. 571—582.

Статья поступила 24 января 1985 г.

SUMMARY

Rhizobium meliloti strains of various virulence were incubated in the medium with NaCl (0; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0; 3.0 %). All strains were characterized by high salt resistance. Strains grown in high salt percentage medium (3 %) retain the ability to inoculate the host-plant and to fix atmospheric nitrogen.