

УДК 631.461.52:633.31/37

## ВЛИЯНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Н. В. ГУЖОВА, Н. Л. ВЕЛИКАНОВ, В. К. ШИЛЬНИКОВА

(Кафедра микробиологии)

Процесс взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями разносторонен и, кроме собственно фиксации азота, приводит к существенным изменениям в развитии и дифференциации тканей, биохимии и физиологии обмена веществ растения-хозяина и его микросимбионта.

В роли первых барьеров на пути клубеньковых бактерий в клетку бобового растения-хозяина выступают клеточная стенка и клеточная мембрана. Считается, что факторы, определяющие специфичность взаимоотношений партнеров, локализованы на мембранах клеток хозяина и микросимбионта. От этого первичного контакта во многом зависит итог их взаимодействия. Именно здесь происходит узнавание растением специфичного микросимбионта [5—7]. От действия клубеньковых бактерий на клеточную мембрану хозяина зависит также его питание.

Имеются достаточные основания полагать, что симбиотические отношения существенно влияют и на проницаемость клеточных мембран растительных тканей, при этом она может являться важным интегральным показателем, характеризующим симбиотический процесс [2—4]. В то же время отсутствуют данные, характеризующие изменения проницаемости в ходе развития симбиотических отношений.

В связи с этим мы изучали динамику изменений проницаемости клеточных мембран листьев и корней гороха, инфицированного *Rhizobium leguminosarum*. Цель исследований — охарактеризовать действие микросимбионта на проницаемость клеточных мембран растения-хозяина на разных стадиях симбиотического процесса — от момента инфицирования до стадии массового образования клубеньков.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучали изменение проницаемости клеточных мембран гороха Грибовского раннего при действии *Rh. leguminosarum* (активные и вирулентные штаммы 224а и 250).

Семена гороха последовательно обрабатывали мыльной водой, 0,3 % раствором формалина (35—40 мин), 15—20 раз — водопроводной водой, денатуратом (20 мин), вновь струей водопроводной воды и замачивали на 12—14 ч в стакане с водой. Затем их раскладывали на влажной фильт-

ральной бумаге в кюветках и проращивали в термостате при температуре 25—27° в течение 2—3 сут. Проростки пересаживали в 3-литровые стеклянные сосуды на водопроводную воду. Через 2 сут воду заменяли питательной смесью Кюпа в разведении 1/10, еще через 3 сут — в разведении 1/5, через 2 сут — 1/2 и еще через 2 сут растения пересаживали на полную смесь Кюпа. Все растворы содержали 1/5 нормы азота. Выращивание проводили в термостатной камере фитотрона МГУ при температуре 25° и освещении 10 000 лк.

Растения инокулировали в возрасте 14—15 дней водной суспензией бактерий.

Культуры клубеньковых бактерий (штаммы 224а и 250), полученные из ВНИИ бактериальных препаратов, выращивали в чашках Петри в термостате при температуре 26° в течение 4 сут на среде следующего состава:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1 г/л, сахара — 10, агар — 15 г/л, водный экстракт гороха — 0,5 л, pH 6,6—7,2. Для приготовления водного экстракта гороха 50 г семян заливали 0,5 л водопроводной воды и кипятили 20 мин. Полученный отвар процеживали через марлю.

Проницаемость тканей определяли через 4 ч, затем через 1, 2, 3, 5, 7, 11, 14 сут после инокуляции. В опыте использовали корни и листья растений. Для каждого определения средняя проба составлялась из 5 растений. Измерения проводили в 3-кратной повторности. Среднее количество опытов 6.

О проницаемости клеточных мембран судили по выходу электролитов из тканей растения в воду. Выход электролитов оценивали количественно методом кондуктометрии.

Ткани растений споласкивали водопроводной водой, промывали, промокали фильтровальной бумагой (из листьев предварительно удаляли крупные жилки) и острым лезвием резали на кусочки размером 1,5 × 1,5 мм. Нарезанный материал помещали в капроновый мешочек и промывали под струей водопроводной воды в течение 30 мин, а затем дистиллированной водой (1 мин), осторожно промокали фильтровальной бумагой и брали навески. Каждую навеску (из расчета 200 мг на 2 мл дистиллированной воды) помещали в стеклянный стакан, куда предварительно наливали дистиллированную воду (отношение

**Проницаемость клеточных мембран тканей корней и листьев гороха (% к контролю) в динамике с момента инокуляции штаммами *Rhizobium leguminosarum* 224a и 250**

Время с момента инокуляции	Листья		Корни	
	224a	250	224a	250
Исходное	105,0±9,0	114,0±9,8	104,7±5,7	107,3±3,7
4 ч	107,0±6,4	112,0±5,5	86,3±6,6	80,9±4,4
1 сут	94,3±6,4	91,6±6,9	87,0±7,5	83,7±7,7
2 »	104,0±10,0	108,7±5,3	90,7±5,7	80,3±6,2
3 »	72,0±3,2	71,0±2,0	96,0±1,6	87,0±1,6
5 »	82,7±14,7	89,3±7,3	72,5±5,2	76,5±1,2
7 »	71,0±10,2	80,0±5,7	92,3±3,7	72,0±6,5
11 »	110,3±19,2	104,0±7,0	110,7±1,2	115,3±8,6
14 »	105,7±3,2	105,3±4,5	110,0±4,5	114,0±3,3

навески к объему воды, в которой настаноятся ткани, должно оставаться постоянным).

Через 30—60 мин настой фильтровали через капроновую ткань и измеряли электропроводность фильтрата. Проницаемость тканей выражали в относительных единицах.

О действии клубеньковых бактерий на проницаемость клеточных мембран судили по процентному соотношению электропроводности настоев тканей инфицированных и контрольных растений.

Статистическую обработку данных проводили по методу, приведенному в [1], при уровне достоверности 0,95.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное процентное отношение (таблица) характеризует состояние проницаемости клеточных мембран растений перед инфицированием относительно контрольных растений.

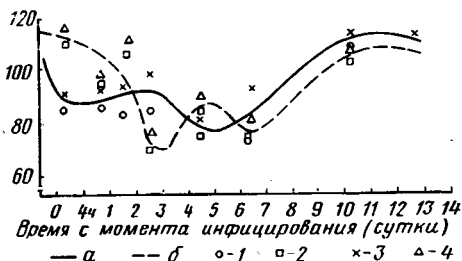
Из тканей корня в опытном варианте уже через 4 ч после инфицирования выход электролитов был на 20 % меньше, чем в контроле. Далее в течение первых трех суток с момента инфицирования наблюдалось некоторое повышение проницаемости, но она была все-таки ниже, чем в контроле. От третьих к пятым суткам инфицирования опять отмечалось уменьшение скорости выхода электролитов в опытном варианте, но начиная с пятых суток она постепенно увеличивалась и к 11—14-м суткам достигала уровня, несколько превышающего контрольный (таблица). Появление видимых клубеньков в нашем опыте наблюдали именно в эти сроки. Подобный характер действия клубеньковых бактерий на проницаемость клеточных мембран корней гороха характерен для двух изучавшихся штаммов.

Выход электролитов из тканей листьев гороха в течение первых двух суток с момента внесения культуры клубеньковых бактерий был практически одинаковым у опытных и контрольных растений. Но уже на третьи сутки с начала развития инфекционного процесса проницаемость клеточных мембран листьев гороха значительно уменьшилась (примерно на 30 %) и вплоть до стадии массового образования клубеньков оставалась на уровне ниже контрольного. Затем к 11—14-м суткам она увеличивалась и достигла контрольной.

Следует отметить, что и в этом случае воздействие штаммов 224a и 250 на динамику проницаемости клеточных мембран было сходным.

Из графика видно, что характер изменения проницаемости клеточных мембран под действием симбионта у листьев и корней аналогичен, только реакция листьев на инфицирование несколько замедлена.

Можно предполагать, что уменьшение проницаемости клеточных мембран корней уже через 4 ч после инокуляции обусловлено реакцией растения на появление чу-



Проницаемость клеточных мембран (% к контролю) листьев (а) и корней (б) гороха в динамике развития инфекционного процесса.

1, 2 — штамм 224a, соответственно корни и листья; 3 и 4 — штамм 250, корни и листья.

жердного объекта в прикорневой зоне. Успешное инфицирование приводит к некоторому возрастанию экзосмоса. Однако оно весьма незначительно. Известно, что инфекционный агент (патоген или симбионт) локально увеличивает проницаемость клеточных мембран растения-хозяина только в месте его внедрения. В противном случае активное возрастание проницаемости клеточных мембран хозяина ослабило бы растение и способствовало бы проникновению вторичной инфекции.

Последующее снижение проницаемости клеточных мембран корней может быть обусловлено положительным действием симбионта на метаболизм растения, в том числе энергетическую эффективность дыхания и фотосинтеза, биосинтез белка. Результатом подобного действия может быть увеличение пластичности мембраны за счет изменения ее структурных компонентов, увеличения их удерживающей способности. В итоге мы наблюдаем уменьшение экзос-

моса — уменьшение проницаемости клеточных мембран.

Увеличение скорости выхода электролитов из растительных тканей к 11—14-м суткам с момента инфицирования, по нашему мнению, обусловлено массовым образованием клубеньков и более активным обменом метаболитами между тканью клубеньков и собственно растением. Следует особо подчеркнуть, что патологического увеличения проницаемости клеточных мембран растения-хозяина мы не наблюдали. Она сохранялась на уровне контроля.

Подобные процессы, видимо, лежат и в основе наблюдаемых изменений проницаемости клеточных мембран листьев.

Одинаковая направленность в изменении проницаемости клеточных мембран корней и листьев гороха под действием обоих штаммов бактерий дает основание предположить, что реакция клеточных мембран растения на инфицирование совместимыми штаммами будет аналогичной. Не исключено, что этот показатель может быть использован как способ оценки вирулентности штаммов клубеньковых бактерий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1971.
2. Кларсон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки. — М.: Мир, 1978.
3. Най П., Тинкер П. Движение растворов в системе почва — растение. — М.: Колос, 1980, с. 365.
4. Петрова И. А., Тарасенко А. А. Симбиотическая азотфиксирующая система бобовых растений. — Физиол. раст., т. 29, № 1, с. 179—181.
5. Хайлова Г. Ф., Жизневская Г. А. Агрехимия, № 12, с. 118—133.
6. Beringer J. — Nature, 1978, vol. 271, N 5642.
7. Brill W. — Scientific Amer., vol. 236, N 3.

*Статья поступила 13 октября 1982 г.*

## SUMMARY

Influence of *Pisum sativum* plant infection by nodule bacteria on the roots and leaves' cell membrane permeability was studied. It was shown that tissue permeability may be used as a characteristic of the infection process before appearance of visible symptoms of plant—microorganisms interaction.