

**Регуляция актиномицетом симбиотических отношений клубеньковых бактерий с клевером луговым**

© 2011. И. Г. Широких<sup>1,2</sup>, д.б.н., зав. лабораторией,

О. В. Рябова<sup>1</sup>, к.б.н., н.с., А. А. Широких<sup>1</sup>, д.б.н., в.н.с.,

<sup>1</sup>ГНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого Россельхозакадемии,

<sup>2</sup>Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и Вятского государственного гуманитарного университета, e-mail: irgenal@mail.ru

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о различном, в зависимости от наличия полимерного источника углерода, влиянии актиномицета *Streptomyces platensis* на симбиотические отношения клевера лугового с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Обсуждается возможность участия мицелиальных прокариот в регуляции инфицирования корней ризобиями на ранних стадиях формирования симбиотических отношений.

The experimental data show that the actinomycete *Streptomyces platensis* influences symbiotic relations of clover with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in a different way, depending on availability of polymer source of carbon. The possibility of mycelial prokaryotes participating in roots infecting with rhizobia at early stages of symbiosis is discussed.

Ключевые слова: стрептомицеты, ризобии, клевер луговой, колонизация корней, нодуляция  
Key words: streptomycetes, rhizobium, red clover, root colonization, nodulation

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), как и другие бобовые культуры, образует симбиоз с клубеньковыми бактериями – ризобиями. Бобово-ризобияльный симбиоз – одна из наиболее изученных надорганизменных систем, во многом благодаря своей практической значимости. Современные исследования генетических основ продуктивности симбиоза показывают, что в процессе взаимодействия растений с ризобиями возникает тесная структурно-функциональная интеграция партнёров, которая основана на перекрёстной регуляции и координированной экспрессии бактериальных и растительных генов [1].

Вместе с тем при интродукции ризобий в почву было обнаружено, что иногда они не оказывали положительного действия на растения, пока не вносили другие ризосферные бактерии. Проникновению ризобиев в растения и установлению симбиоза способствовали так называемые бактерии – «хелперы». Внесение таких пар культур, как *Rhizobium* – *Azospirillum* или *Rhizobium* – *Bacillus polytuxa*, в 2-3 раза увеличивало число клубеньков у растений [2]. Другие авторы отмечали положительный эффект (увеличение нодуляции и сухой массы проростков) от совместной инокуляции сои культурами *Streptomyces*

*griseus* и *Bradirhizobium japonicum* при покрытии семян хитином [3]. Благодаря выраженной экзогидролазной активности актиномицеты расщепляют в почве различные полимерные соединения, которые становятся доступными микроорганизмам других трофических блоков. Получены убедительные данные о существовании между мицелием актиномицетов и микроколониями клубеньковых бактерий *in situ* тесной положительной связи, близкой к функциональной [4]. Участвуя в регуляции численности свободноживущих в почве клубеньковых бактерий, актиномицеты могут играть важную роль в образовании клубеньков на корнях растений и, следовательно, в симбиотрофном питании бобовых культур.

Для понимания межорганизменных взаимодействий в их естественной среде обитания необходимым этапом является моделирование сообществ. В связи с этим изучали влияние последовательной интродукции *Streptomyces platensis* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* на симбиотрофию клевера лугового в модельном эксперименте для разработки путей направленного регулирования и повышения симбиотической эффективности искусственных бобово-ризобияльных систем.

**Объекты и методы**

Влияние интродукции клубеньковых и мицелиальных бактерий на развитие растений клевера лугового изучали в гнотобиотической системе в стеклянной посуде со стерильным кварцевым песком, увлажнённым (10% объём/вес) питательным минеральным раствором Красильникова-Кореньяко [5]. Варианты интродукции приведены в таблице 1.

Согласно схеме опыта, в вариантах 1, 4 и 6 в качестве полимерного источника углерода в песчаный субстрат в количестве 1% от его веса добавляли крахмал, при гидролитическом расщеплении которого образуются доступные клубеньковым бактериям мономеры. В качестве интродуцентов использовали штаммы *Streptomyces platensis* 4-кл-3 (рис. 1, см. цветную вкладку) и *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б (рис. 2, см. цветную вкладку), выделенные нами из ризосферы клевера лугового на дерново-подзолистой почве. В чистой культуре *S. platensis* 4-кл-3 оказывал стимулирующее действие на рост бактерий *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б [6]. Культуры микроорганизмов для интродукции выращивали на жидких питательных средах. Для стрептомицета использовали среду Гаузе 1 [7], для ризобий – маннитно-дрожжевую среду [8]. Посевы культур *S. platensis* 4-кл-3 и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б инкубировали на качалке при 25 °С в течение 9-и и 7-и суток соответственно. Популяции стрептомицетов и ризобий вносились в различные сроки. Культуру стрептомицета вносили в песок в количестве  $1,0 \times 10^5$  КОЕ/г при закладке опыта, а спустя 7 сут – культуру клубеньковых бактерий в количестве  $2,0 \times 10^4$  КОЕ/г песка. Ещё через 7 сут стерилизованные (15 мин.) концентрированной серной кислотой и проращенные в течение 1 сут семена клевера (сорт Трио) асептически помещали на 5 мм в глубь кварцевого песка. Повторность опыта 25-кратная. Растения выращивали в климатической камере при 23 °С и фотопериоде 16 час.

Численность интродуцированных микроорганизмов определяли в песке перед закладкой растений (на 14-е сутки от начала опыта) и на корнях растений в возрасте 41 сут, для чего у 3-х растений в каждом варианте стерильно отделяли корневую систему от надземной части. Корни растений, принадлежащих к одному варианту, объединяли и отмывали в колбе со 100 мл стерильной воды, взбалтывая в течение 5 мин. Отмытые от песка корни гомогенизировали в ступке и готовили серию разведений для посева на плотные питательные среды. Численность стрептомицетов учитывали на агаре Гаузе 1, ризобий – на маннитно-дрожжевом агаре. Сухую массу корней определяли гравиметрически после фильтрования суспензии и последующего высушивания фильтров. У остальных растений в каждом варианте определяли линейные размеры и сухую биомассу надземной части и корней, количество листьев, количество клубеньков на 1 растении и в пересчёте на 1 г сухих корней.

Статистическую обработку производили с помощью дисперсионного анализа с использованием программы STATGRAFICS Plus.

**Результаты и обсуждение**

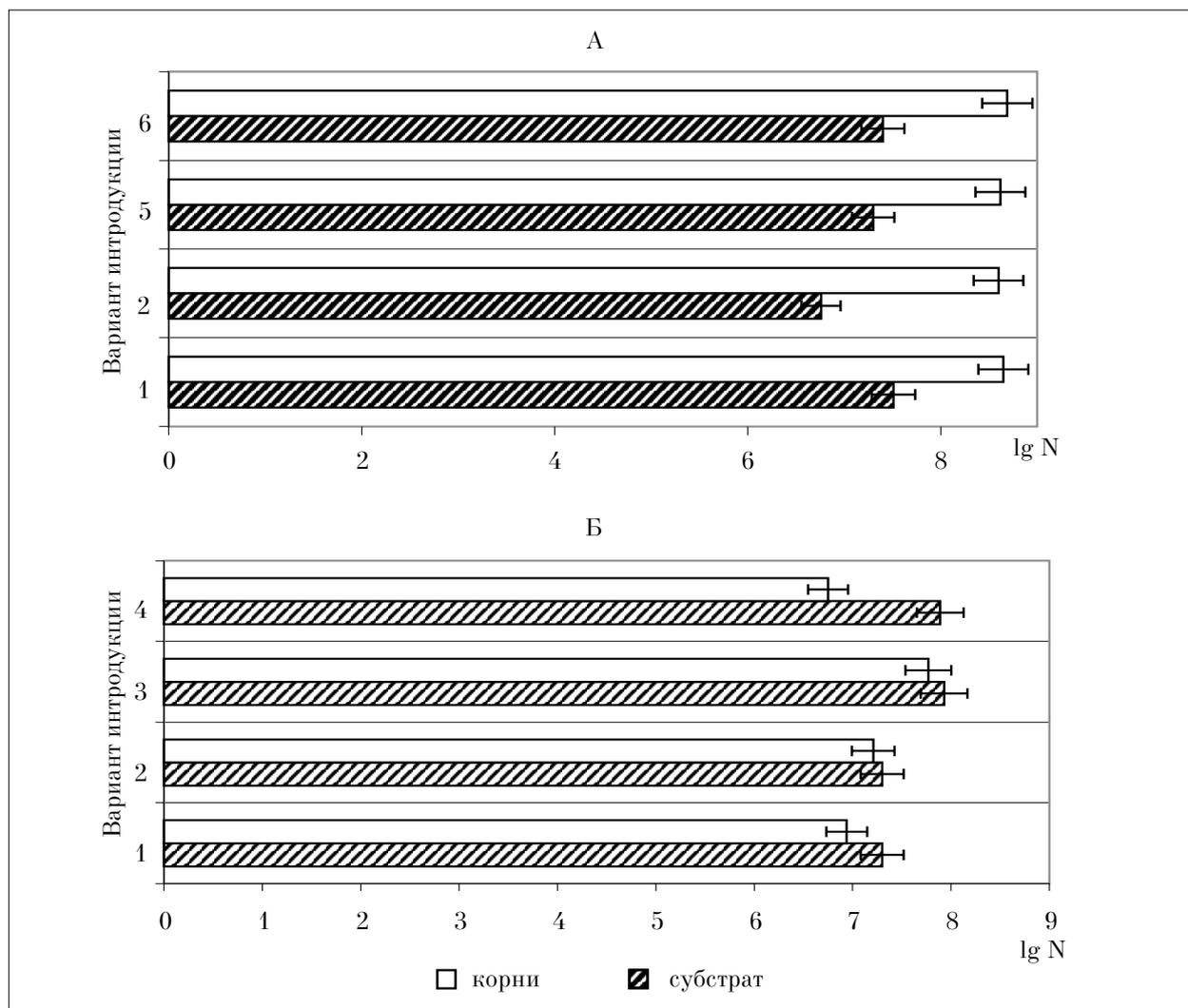
Анализ численности интродуцированных в гнотобиотическую систему микроорганизмов, проведённый до введения в неё растений клевера, показал, что численность *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б увеличилась за период прединкубации на три порядка, а численность *S. platensis* 4-кл-3 – на два порядка к первоначальному уровню, составив в среднем по вариантам соответственно  $2,1 \times 10^7$  и  $5,2 \times 10^7$  КОЕ/г (рис. 3). Внесение крахмала не оказало существенного влияния на численность КОЕ стрептомицета в песчаном субстрате, тогда как интродукция ризобий – в вариантах 1 и 2 – существенно снижала его численность по сравнению с ростом *S. platensis* 4-кл-3 в чистой культуре (вар. 3 и 4).

**Таблица 1**

Схема опыта

Компоненты	Варианты					
	1	2	3	4	5	6
Растение клевера	+	+	+	+	+	+
Бактерии рода <i>Rhizobium</i>	+	+	–	–	+	+
Бактерии рода <i>Streptomyces</i>	+	+	+	+	–	–
Крахмал	+	–	–	+	–	+

Примечание: знак «+/-» означает присутствие/отсутствие компонента в модельной системе.



**Рис. 3.** Численность (lgN, КОЕ/г) интродуцированных популяций *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б (А) и *Streptomyces platensis* 4-кл-3 (Б) в песчаном субстрате и на корнях растений клевера лугового

Популяционная плотность ризобий в варианте 1 ( $32,8 \times 10^6$  КОЕ/г), где развитие интродуцентов происходило в присутствии крахмала, была почти в 6 раз выше, чем во 2-м варианте – без дополнительного источника питания ( $5,7 \times 10^6$  КОЕ/г). Это говорит о возникновении между интродуцентами метабиотических взаимоотношений, основанных на использовании одним организмом продуктов обмена другого в качестве трофического субстрата. Так, при посеве бинарной суспензии бактерий на плотную среду с крахмалом вокруг образуемых стрептомицетом колоний наблюдали скопление колоний *R. leguminosarum* (рис. 4, см. цветную вкладку). Обладая, как и большинство представителей порядка Actinomycetales, экзогидролазной активностью, *S. platensis* 4-кл-3 способствовал снабжению ризобий продуктами гидролиза крахмала.

На 41-е сутки от начала совместного культивирования растений и микроорганизмов в

системе *in vitro*, плотность заселения корней *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 27-2Б составила  $4,2-4,9 \times 10^8$  КОЕ/г, вне зависимости от уровня численности популяции в песке (рис. 3). Эти результаты соответствуют ранее полученным *in situ* данным, что уровень стабилизации численности клубеньковых бактерий непосредственно на корнях растений не зависит от исходной численности популяции в окружающей почве [9]. Колонизация корней ризобиями не зависела также и от наличия в песчаном субстрате крахмала, в то время как популяция стрептомицета на корнях клевера в условиях обогащения среды крахмалом имела на порядок меньшую плотность ( $5,7 \times 10^6$  КОЕ/г), чем в его отсутствие ( $5,9 \times 10^7$  КОЕ/г). Выявленные различия в стратегии выживания интродуцентов при обогащении среды источником углерода в полимерной форме вполне закономерны, поскольку стрептомицеты и клубеньковые

Таблица 2

Влияние интродукции культур *Streptomyces platensis* 4-кл-3 и *Rhizobium leguminosarum* by. *trifolii* 27-2Б на биометрические показатели клевера лугового при выращивании в системе *in vitro*

Вариант	Количество клубеньков		Биомасса растения, мг	Масса надземной части ( $M_{\text{надз}}$ ), мг	Масса корней ( $M_{\text{к}}$ ), мг	Высота надземной части ( $L_{\text{надз}}$ ), мм	Длина корней ( $L_{\text{к}}$ ), мм	Соотношение	
	на 1 растение	на 1 г корней						$M_{\text{к}} / M_{\text{надз}}$	$L_{\text{к}} / L_{\text{надз}}$
1	3±2	201*	17,9	3,8*	14,1*	22*	40*	3,7	1,8
2	17±2*	1791	17,0	7,8	9,2	66	52	1,8	0,8
3	0	0	18,0	9,2	8,8	76	55	1,0	0,7
4	0	0	8,8*	3,2*	5,6*	27*	43	1,8	1,6
5	2±2	402	17,3	11,4	5,9	99	48	0,5	0,5
6	5±2	763	20,3	13,4	6,9	90	41	0,5	0,5

Примечание: Описание вариантов см. в таблице 1. \*Различия достоверны при  $P \geq 0,05$ .

бактерии являются представителями различных функциональных групп.

При совместной интродукции стрептомицета и ризобий (вар. 1 и 2) плотность заселения корней мицелиальными прокариотами уступала на порядок плотности стрептомицета в случае его интродукции в чистой культуре (вар. 3), что соответствует представлениям об актиномицетах как K-стратегах, менее конкурентоспособных в ризосфере растений по сравнению с типичными r-стратегами – клубеньковыми бактериями [10].

Структурную основу функционирования симбиоза составляют образуемые растениями клубеньки. Наибольшее (17±2 шт./раст.) за период наблюдений количество клубеньков на корнях клевера сформировалось при последовательной интродукции в субстрат стрептомицета и ризобий (табл. 2). Механизм стимуляции образования клубеньков стрептомицетом может быть связан с образованием на корнях дополнительных локусов инфицирования. Поскольку в свете современных представлений [1] формирование симбиоза между клубеньковыми бактериями и растением связано не столько с активным внедрением микросимбионта в корневые волоски, сколько обусловлено гидролизом клеточной стенки собственными ферментами растения, продуцируемые стрептомицетом гидролазы могли внести дополнительный вклад в процесс нодуляции.

На молекулярном уровне развитие клубеньков у растения-хозяина индуцируют синтезируемые ризобиями Nod-факторы, близкие по химической структуре к олигомерам хитина [11]. Так как непосредственно взаимодействует с растительными рецепторами не сам Nod-фактор, а продукты его процессинга, которые образуются в клетке-мишени под действием литических ферментов, широко рас-

пространённая среди стрептомицетов способность продуцировать хитиноподобные ферменты [10] может служить ещё одним объяснением вероятного механизма стимуляции образования клубеньков стрептомицетом. Однако высказанные предположения справедливы только для условий, когда корневые выделения являлись единственным источником углерода в системе. Обогащение среды крахмалом значительно снижало активность нодуляции в присутствии стрептомицета (вар. 1) и количество клубеньков на одном растении, как и в остальных вариантах (2–5 шт./раст.) опыта, существенно между собой не различалось.

Растения варианта 1 характеризовались минимальным количеством клубеньков в пересчёте на единицу сухой массы. Визуально наблюдали утолщение корней растений при незначительном их росте в длину. Соотношение биомассы корней и надземной части в этом варианте составило 3,7, что свидетельствует о нарушении гормонального баланса растений [12]. Продуцировать фитогормоны способны как стрептомицеты [13], так и бактерии рода *Rhizobium* [14]. Высокая численность той и другой популяций в условиях обогащения среды крахмалом, очевидно, привела к избытку в среде экзогенного ауксина, что обусловило торможение роста корней в длину и их утолщение. Такой характер роста может быть губительным для растения.

Активное клубенькообразование при интродукции стрептомицета и ризобий в варианте 2 – без добавления крахмала – тоже не привело к повышению биометрических показателей растений: линейные размеры и сухая биомасса клевера существенно не отличались от аналогичных показателей в варианте с чистой культурой клубеньковых бактерий (вар. 5), а соотношение массы и линейных размеров корней

и надземной части растений увеличилось (табл. 2) по массе – более чем в 3 раза. Известно, что бобовые способны к жесткой регуляции клубенькообразования, которая опосредована надземной частью [1]. Специфические механизмы авторегуляции процесса образования клубеньков позволяют растениям избегать избыточного количества клубеньков и тем самым экономить энергию, которая при симбиозе всегда в дефиците. Образование большого числа клубеньков под воздействием экзогидролазной активности стрептомицета, очевидно, обусловило перерасход энергии, что проявилось некоторым угнетением надземной части растений.

Выращенные *in vitro* без ризобий, но в присутствии стрептомицета (вар. 3 и 4) растения клевера не имели на корнях клубеньков и при добавлении в среду крахмала (вар. 4) характеризовались существенно более низкими значениями биометрических параметров (табл. 2). В варианте 3, где отсутствовал дополнительный к корневой экскреции источник углерода, взаимодействие стрептомицета и растений обеспечило макросимбионту линейные размеры и накопление сухой массы на уровне вариантов с интродукцией в систему клубеньковых бактерий (вар. 2, 5 и 6). Все растения, выращенные в присутствии культуры *S. platensis* 4-кл-3, отличались более высоким (1,0-3,7) соотношением биомассы корней и надземной части в сравнении с растениями, выращенными при введении в среду только культуры ризобий (0,5-0,6) – вар. 5 и 6.

### Выводы

При разработке новых способов повышения эффективности искусственных бобово-ризобиальных систем необходимо учитывать следующее:

1. Способность культуры *S. platensis* 4-кл-3 оказывать стимулирующее влияние на нодуляцию клевера лугового клубеньковыми бактериями *R. leguminosarum* 27-2Б проявилась в условиях, когда единственным источником углерода в среде служили корневые выделения растений.

2. В присутствии дополнительного источника углерода (крахмал) результатом взаимодействия популяций стрептомицета и ризобий явилось повышение численности клубеньковых бактерий в песчаном субстрате, но не на корнях растений; не возросла, против ожидаемого, и активность нодуляции корней. Более того, растения при совместном введении в систему ризобий, крахмала и способного к его

ферментативному расщеплению стрептомицета имели явные признаки угнетения, характерные для нарушений, обусловленных избытком экзогенного ауксина.

3. Стрептомицет, в отсутствие конкуренции со стороны ризобиев, более активно колонизировал корни и оказывал на растение стимулирующее действие, сопоставимое по эффектам на ранних стадиях развития с клубеньковыми бактериями. Но, в отличие от ризобий, стрептомицетная стимуляция сильнее выражена в отношении корней, чем в отношении надземной части растений.

### Литература

1. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. И.А.Тихоновича, Н.А.Проворова. С-Пб.: Наука, 1998. 194 с.
2. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. 282 с.
3. Li D.-M., Alexander M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by *Rhizobium* // Plant and Soil. 1988. V. 108. P. 211–219.
4. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ, 1989. 175 с.
5. Красильников Н.А., Коренько А.И. Влияние клубеньковых бактерий на азотфиксацию клевера в условиях стерильных культур // Микробиология. 1946. Т. 15. № 4. С. 279–283.
6. Широких И.Г., Широких А.А., Мерзаева О.В., Тумасова М.И. Актиномицеты ризосферы клевера лугового на дерново-подзолистой почве // Почвоведение. 2004. № 7. С. 875–881.
7. Определитель актиномицетов. Роды *Sreptomycetes*, *Streptovercillium*, *Chainia*/ Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др. М.: Наука, 1983. 248 с.
8. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1983. Т. 2. 469 с.
9. Лисичкина Г.А., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Динамика численности *Rhizobium japonicum* в ризоплане и ризосфере различных растений // Микробиология. 1983. Т. 52. Вып. 4. С. 646–650.
10. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001. 257 с.
11. Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журнал общей биологии. 2002. Т. 63. № 6. С. 451–472.
12. Регуляторы роста растений / Под ред. Г.С. Муромцева. М.: Колос, 1979. 246 с.
13. Калакуцкий Л.В., Шарая Л.С. Актиномицеты и высшие растения // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1990. № 24. С. 26–65.
14. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М.: Наука, 1968. 532 с.