

Изучение полигалактуроназы ризобий в чистой культуре и при инфицировании бобовых растений

Л. А. АВETИСОВ

*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090 Новосибирск, ул. Золото долинская, 101*

АННОТАЦИЯ

Изучалось содержание полигалактуроназы в чистых культурах клубеньковых бактерий и на начальных этапах инфицирования бобовых ризобиями. Показано присутствие этого фермента в чистых культурах клубеньковых бактерий. Отмечается увеличение синтеза полигалактуроназы в вариантах со специфическим и неспецифическим инфицированием.

К функциям растительных клеточных стенок относятся предохранение протопласта от механических повреждений, защита растительных тканей от высыхания, поддержание формы клеток при изменении осмотического давления в окружающей среде, защита при микробных атаках. Способность растительных клеточных стенок выполнять эти функции зависит от свойств этого суперполимера: фракционного состава, варьирования различных полимеров в его составе, наличия ковалентного связывания между молекулами клеточных стенок.

Внедрение клубеньковых бактерий в ткани корней бобовых происходит вследствие невыясненного пока механизма, в основе которого лежит изменение свойств клеточных стенок корневых волосков и затем стенок коры корня. Известно несколько гипотез, объясняющих механизм внедрения клубеньковых бактерий в ткани бобовых [1–5]. Несмотря на некоторую их противоречивость, в основе концепций – некий биологический механизм, изменяющий растительные клеточные стенки, особенно в точках контакта с бактериями. В пользу такого утверждения говорят как структурные [4–7], так и биохимические, физиологические иссле-

дования взаимодействия растений и клубеньковых бактерий [7–9].

До середины 70-х годов большинство исследователей склонялось к тому, что клубеньковые бактерии в чистой культуре не синтезируют полигалактуроназы [10, 11]. Хаббел и сотрудники [7] показали присутствие полигалактуроназы в чистых культурах ризобий методом чашечной культуры и предположили, что неудачные попытки обнаружения данного фермента в чистых культурах связаны с низкой разрешающей способностью использованных предшествующими исследователями методов.

Вследствие обнаружения нами изменений в составе полиуронидсодержащих фракций клеточных стенок [12, 13] проведено изучение полигалактуроназы у различных видов клубеньковых бактерий в чистой культуре и при инфицировании бобовых совместимыми и несовместимыми видами бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение уровней эндополигалактуроназы (фермента, гидролизующего пектины) в чистых культурах клубеньковых бактерий прово-

дили на *Rhizobium trifolii*, штаммы 318 и 159, и *Rh. leguminosarum*, штаммы 250 и 245 (все штаммы из коллекции культур ВНИИ сельхозмикробиологии). Бактерии культивировали на гороховой среде в темноте при 27 °С на чашках Петри. В опытах использовали трехсуточные культуры бактерий, которые суспендировали в дистиллированной воде и переносили суспензию на чашки Петри, содержащие 0,5 % пектин в 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0. Содержание агара в среде составляло 1,5 %. На этой среде бактерии инкубировали 5–7 дней для индукции синтеза полигалактуроназы.

В опытах по изучению влияния инфицирования на полимерный состав клеточных стенок и уровень полигалактуроназы на ранних стадиях взаимодействия использовали 7–10-дневные проростки семян клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), гороха посевного (*Pisum sativum* L.), эспарцета песчаного (*Onobryhis sibirica* (Sirj) Turcz. ex Grossh). Стерилизованные семена раскладывали на чашки Петри с 0,9 % голодным агаром, выдерживали их в термостате в течение трех дней. Инфицирование проводили густой суспензией клубеньковых бактерий. Инкубацию проростков с бактериями проводили в темноте при 27 °С. На 7–10-й день после посева у проростков отделяли корни, средняя проба которых служила материалом для анализа. Чашки, в которых отмечали посторонний бактериальный и грибной рост, из опытов выбраковывали. Контролем служили секции корней неинфицированных растений.

Определение активности полигалактуроназы по снижению вязкости реакционной смеси

Растительный материал, бактериальную массу растирали в ступке с 0,1 М ацетатным буфером рН 5,0 на холоде. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 г в течение 20 мин при 5 °С, повторно промывали 0,1 М ацетатным буфером рН 5,0. Супернатанты двух экстракций объединяли, доводили до определенного объема. Полученный раствор является экстрактом полигалактуроназы.

Пектин, используемый в качестве субстрата для определения активности полигалактуроназы, экстрагировали этанолом для отделения спирторастворимых полимеров: 20 г пектина суспендировали в 200 мл 70 % этилового спирта

(по объему) и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре, промывку проводили на воронке Бюхнера под вакуумом, процедуру повторяли 3 раза, и окончательно промывали пектин 96 % этиловым спиртом и высушивали при комнатной температуре.

Для приготовления 0,5 % раствора пектина 1 г его суспендировали в 150 мл дистиллированной воды. Добавляли 20 мл 1 М раствора натрий-ацетатного буфера рН 5,0. Для полного растворения пектина суспензию титровали 1 М NaOH и снова доводили рН до 5,0 с добавлением 0,5 М уксусной кислоты. После этого доводили общий объем до 200 мл, после чего нерастворимый осадок отделяли центрифугированием при 1000 г в течение 10 мин.

Реакционная смесь состояла из раствора пектина в конечной концентрации 0,5 % (в 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0) и 1 мл ферментного экстракта. Для предотвращения микробного и грибного загрязнения в реакционную смесь добавляли несколько капель толуола. Время истечения измеряли в стандартном вискозиметре Освальда через определенные промежутки времени. Активность в процентах выражали в зависимости от времени инкубации и вычисляли по формуле:

$$A = \frac{V_{40_0} - V_{4_T}}{V_{40_0} - V_{4_{c0}}} \cdot 100,$$

где А – падение вязкости, %

V_{40_0} – начальное время истечения субстрата с инактивированным ферментом, с

V_{4_T} – время истечения субстрата с активным ферментным раствором после инкубации в течение определенного промежутка времени, с

$V_{4_{c0}}$ – время истечения буферного раствора с ферментом, с.

Калориметрическое определение активности полигалактуроназы

Подготовку субстрата и экстракцию фермента проводили так же, как и при вискозиметрическом определении полигалактуроназы. Навески растительного или бактериального материала в количестве 1 г экстрагировали в 0,5 мл 0,1 М ацетатного буфера рН 5,0. Реакционная смесь состояла из 5 мл 0,5 % пектина в 0,1 М ацетатном буфере рН 5,0 и 5 мл ферментного экстракта (инкубируется в термостате при

30 °С). Аликвоты по 1 мл отбирали сразу после смешивания и через определенные отрезки времени. Их смешивали с 5 мл 96 % этилового спирта и кипятили с обратным холодильником для осаждения пектина и инактивации полигалактуроназы. Спирт удаляли декантацией, осадки промывали 70 % этиловым спиртом, 3–4 раза дистиллированной водой. После удаления спирта из спиртонерастворимого осадка дистиллированной водой извлекали пектин. Экстракты доводили до определенного объема и определяли в них содержание пектина карбазольным методом. Активность полигалактуроназы выражали в процентах от исходного содержания пектина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа полигалактуроназной активности чистых культур клубеньковых бактерий представлены в табл. 1.

Из шести изученных штаммов у двух отмечалось незначительное повышение уровней полигалактуроназы по сравнению с контролем – у *Rh. trifolii* (штамм 159) и *Rh. leguminosarum* (штамм 245). Таким образом, можно отметить, что два из шести изученных штаммов имеют полигалактуроназу в чистой культуре. Поскольку у многих исследователей попытки найти этот фермент в чистой культуре вискозиметрическим методом не увенчались успехом, возможно, полученные нами результаты объяснялись загрязнением нашей культуры другими микроорганизмами, так как серьезной очистки штаммов не проводилось. В то же время полигалактуроназная активность шести изученных

штаммов проводилась в трех независимых опытах, и во всех случаях отмечалась ферментативная активность у этих штаммов. Связывать полученные результаты с ошибкой опыта, по-видимому, нельзя. Для окончательного решения этого вопроса мы решили использовать более чувствительный спектрофотометрический метод определения полигалактуроназы (см. табл. 1). При использовании этого метода отмечалось наличие ферментативной активности у всех изученных нами штаммов клубеньковых бактерий. Наиболее высокое содержание полигалактуроназы отмечалось у штаммов 159 и 245, которые демонстрировали присутствие этого фермента и при определении вискозиметрическим методом. Полученные результаты объясняются, по нашему мнению, высокой разрешающей способностью использованного нами метода и согласуются с данными, полученными Хаббелом и др. [7].

Эти данные ставят вопрос о роли полигалактуроназы в метаболизме клубеньковых бактерий: во-первых, в бобово-ризобияльном симбиозе, во-вторых – во время существования ризобий в почве.

Для ответа на первый вопрос нами был поставлен опыт по определению активности этого фермента в корнях бобовых, инфицированных специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий.

Уровни полигалактуроназы в корнях проростков клевера лугового и гороха посевного, инфицированных специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий, представлены в табл. 2. Инфицирование специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий индуцирует незначительные увеличения уровней полигалактуроназы в тканях корней. Не отмечено повышения уровней полигалактуроназы в вариантах со специфической бактериализацией, описанного Люнгреном [10]. С другой стороны, инфицирование достоверно повышает содержание полигалактуроназы в тканях растений. Отмеченное нами ранее снижение водорастворимых полисахаридов [12, 13], по-видимому, связано с повышением синтеза этих ферментных систем при инфицировании.

Т а б л и ц а 1

Полигалактуроназная активность чистых культур клубеньковых бактерий

Объект	Номер штамма	Падение вязкости	Гидролизованный пектин
<i>Rhizobium trifolii</i>	318	0	1,21 + 0,3
<i>Rh. leguminosarum</i>	159	1,4 + 0,6	2,71 + 0,4
<i>Rh. leguminosarum</i>	250	0	1,05 + 0,2
<i>Rh. simplex</i>	245	1,3 + 0,7	2,65 + 0,3
<i>Rh. simplex</i>	820	0	1,90 + 0,5
дикий штамм		0	1,69 + 0,1

Т а б л и ц а 2

Полигалактуроназная активность корней проростков клевера лугового и гороха посевного, инфицированных специфическими и неспецифическими штаммами ризобий

Объект	Штамм	Совместимость	Активность полигалактуроназы, % /г сырой массы
<i>Trifolium pratense</i> L.	318	+	0,74 + 0,01
	159	+	0,65 + 0,02
	250	-	0,72 + 0,01
	245	-	0,69 + 0,00
	820	-	0,73 + 0,01
Контроль			0,61 + 0,02
<i>Pisum sativum</i> L.	250	+	0,92 + 0,05
	245	+	0,83 + 0,03
	159	-	0,84 + 0,02
	318	-	0,93 + 0,01
	820	-	0,80 + 0,03
Контроль			0,70 + 0,02

П р и м е ч а н и е. + совместимые, - несовместимые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о существенной роли полигалактуроназы во взаимоотношениях бобовых с клубеньковыми бактериями. Присутствие полигалактуроназы в чистых культурах ризобий свидетельствует о ее возможном участии в процессе внедрения бактерий в ткани бобовых. Кроме того, возможно, что присутствие этого фермента связано с тем, что он необходим ризобиям во время их несимбиотической стадии развития. Используя ферментные системы, гидролизующие клеточные стенки, клубеньковые бактерии получают метаболиты и энергию, находясь в почве. В этом плане интересно наблюдение Хаббела и др. [7], что данные ферментные системы имеют бактерии умеренных широт, а бактерии тропических широт их не имеют. По мнению автора, это связано с тем, что в тропических широтах ткани корней и корневых волосков имеют больше шансов на повреждение, чем в умеренных широтах. Возможно, что дело тут не в повреждениях, а в экологии существования клубеньковых бактерий во время несимбиотической стадии. На настоящий момент не ясно, какой из этих двух возможных путей использования данных ферментных систем наиболее значим в экологии бактерий, но большинство исследователей

полагает, что обнаружение их в чистых культурах бактерий говорит об их участии в процессах внедрения ризобий в бобовые растения.

Увеличение содержания полигалактуроназы при инфицировании бобовых клубеньковыми бактериями ставит ряд вопросов: во-первых, за счет чего происходит это увеличение, синтезирует этот фермент само растение, или увеличение происходит за счет полигалактуроназ, синтезируемых бактериями; во-вторых, каковы физиологические и биохимические механизмы, лежащие в основе такого увеличения синтеза, если он происходит за счет увеличения синтеза полигалактуроназ растения; и, в-третьих, какой биологический смысл такое увеличение имеет для создания и функционирования симбиоза.

По нашим представлениям, отмеченное увеличение ферментативной активности происходит за счет растительных полигалактуроназ, поскольку, как видно из полученных результатов, активность полигалактуроназы в чистых культурах бактерий очень мала и не может давать заметный вклад при использованных дозах инокулята. Вопрос о механизмах индукции синтеза данного фермента при инфицировании, по-видимому, очень сложен и требует специального изучения. Возможно, инфицирование изменяет гормональный баланс растения, вследствие чего повышается синтез ИУК, которая, как известно, стимулирует синтез полигалактуроназы в растительных тканях [14]. Увеличение синтеза полигалактуроназы в растительных тканях приводит к тому, что стеночный суперполимер становится более пластичным, и это позволяет более благоприятно осуществлять внедрение и дальнейшее функционирование симбиотической системы. В работе по изучению клеточных стенок клубеньков бобовых нами показано, что они намного более пластичны, чем у корней, что и позволяет бобовым и ризобиям успешно функционировать [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. H. G. Thornton, *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1952, **139**: 895, 170-176.
2. P. S. Nutman, *Biol. Revs.* 1956, **31**: 2,109-152
3. P. S. Nutman, *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1969, **172**, 417-437.
4. З. М. Яковлева, Бактероиды клубеньковых бактерий, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1975.

5. З. М. Яковлева, Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1977.
6. D. Callaham, J. G. Torrey, *Ibid.*, 1981, **59**: 9, 1647–1664.
7. D. H. Hubbell, V. M. Morales, M. Umali-Gareia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, **35**: 1, 210–213.
8. G. B. Turgeon, W. D. Bauer, *Planta*, 1985, **163**: 3, 328–349.
9. E. Martinez-Molina, V. M. Morales, D. H. Hubbel, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, **36**: 6, 1186–1188.
10. H. Ljunggren, *Physiol. Plantarum Suppl.*, 1969, 82.
11. В. К. Шильникова, А. М. Шатта, З.И. Векслер, К. Г. Агаджанян, *Изв. ТСХА*, 1974, 3, 3–7.
12. Г. Г. Майстренко, Л. А. Аветисов, Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1982, 15–20.
13. Л. А. Аветисов, Г. Г. Майстренко, *Изв. СО АН СССР, Сер. Биол.*, 1989, 2, 67–70.
14. К. Дёфлинг, Гормоны растений, М., Мир, 1985.
15. Л. А. Аветисов, *Физиология растений*, 1982, **29**: 2, 396–399.

Study of Rhizobium Polygalacturonase in a Clean Culture and in Infected Leguminous Plants

L. A. AVETISOV

Polygalacturonase content was studied in a clean culture of nodule bacteria and at the initial stages infecting leguminous plants by Rhizobium.

The presence of this enzyme in the clean culture of nodule bacteria was established. An increase of polygalacturonase synthesis was noted in specific and non-specific infecting.