

Н. А. Белявская, Н. А. Козыровская,
Л. А. Кучеренко, Е. Л. Кордюм, В. А. Кордюм

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* С РАСТЕНИЕМ.

1. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С КОРНЯМИ ПРОРОСТКОВ РИСА

С помощью электронной микроскопии исследовали локализацию *Klebsiella oxytoca* VN13 в корнях риса, а также их взаимодействие. Эти исследования, во-первых, свидетельствуют о локализации бактерий в слизи на поверхности корней и в периферических корневых клетках и о возрастании их количества от базального к апикальному концам корня; во-вторых, указывают на то, что проникновение этих бактерий в клетки хозяина осуществляется посредством гидролиза оболочек клеток корневых ферментами бактерий; в-третьих, позволяют предположить, что влияние бактериальной инвазии ограничивается периферическим слоем клеток корней двухнедельных проростков риса.

Введение. Поиск естественных ассоциаций высших растений с азотфиксирующими микроорганизмами является одной из актуальных проблем снабжения биологическим азотом сельскохозяйственных растений. Эндофитные ассоциации азотфиксирующих бактерий с растением имеют устойчивые связи, выработанные в процессе эволюции и, таким образом, представляют собой интересную модель для изучения различного рода взаимодействий бактерий с растением. Кроме того, эндофитные бактерии, имеющие экологическую нишу в тканях растения, перспективны для практического использования: они осуществляют доставку в растение биологического азота, биопестицидов, фитогормонов и пр. Из тканей диких и культурных злаков, росших на бедных почвах, выделены различные diaзотрофы, которые относятся к родам *Azospirillum* [1], *Campylobacter* [2], *Zooglea* [3], *Azoarcus* [4], *Herbaspirillum* [5], *Klebsiella* [6], *Acetobacter* [7]. Однако в настоящее время информации, касающейся механизмов процесса колонизации растения и проникновения несимбиотических diaзотрофов внутрь тканей растений, недостаточно. На сегодня существует несколько предположений относительно путей попадания несимбиотических diaзотрофов в органы высших растений, среди которых наиболее часто рассматриваются следующие возможности: 1) проникновение бактерий в ткани растения-хозяина через раневые поверхности [8]; 2) посредством ферментативных процессов [9]. Проведенные нами исследования взаимодействия эндофитной бактерии *Klebsiella oxytoca* с корнями риса, целью которых было изучение контактов, взаимодействия и включения микроорганизмов в клетки корней этого растения, представили доказательство, согласующиеся с последней гипотезой.

Материалы и методы. Азотфиксирующая бактерия *K. oxytoca* VN13 выделена из тканей корня риса, выращенного на чеках Вьетнама [6]. Стерилизацию семян риса (сорт 8423, получен из Ин-та эксперим. биотехнологии Нац. науч. центра СРВ, Хошимин), бактерилизацию семян и выращивание проростков проводили, как описано в [6].

Корни двухнедельных проростков риса фиксировали 2 %-м раствором глутарового альдегида («Serva», ФРГ) в 0,1 М какодилатном буфере («Serva», ФРГ), pH 7,0 в течение 20 ч на холоду. После промывки тем же буфером материал обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетоне. В 70 %-й раствор спирта вносили

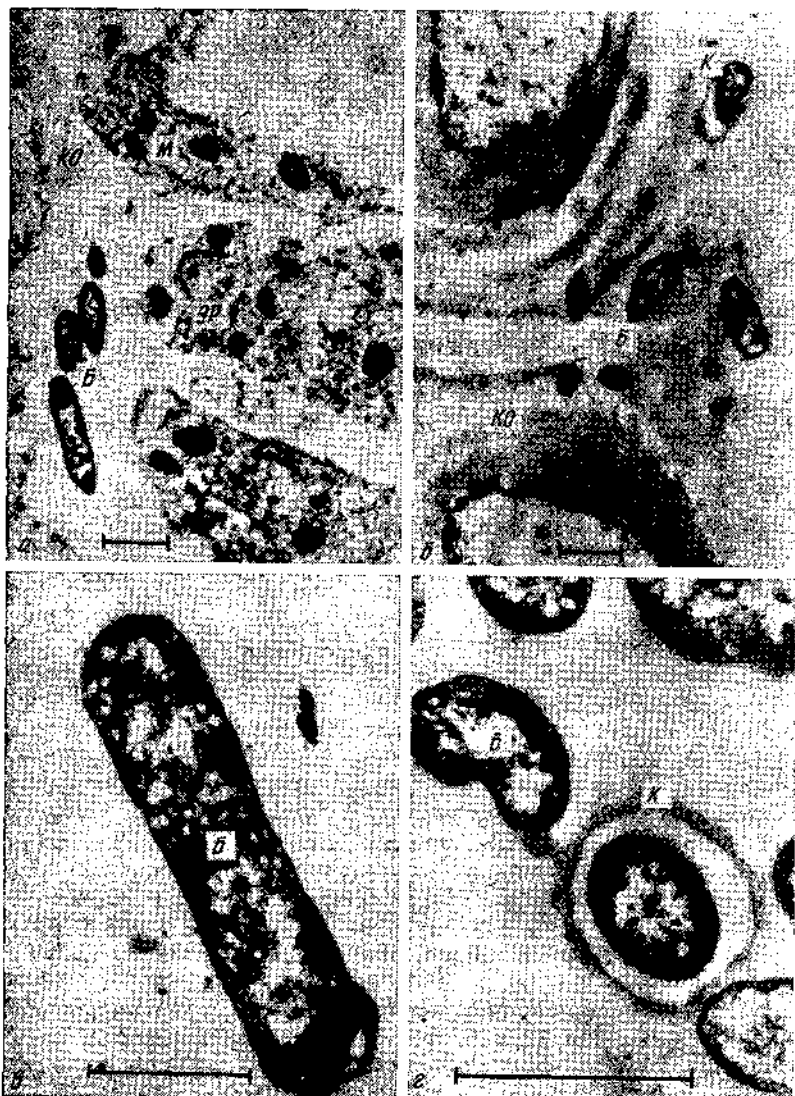


Рис. 1. Эндофитные бактерии в поверхностном слое клеток корней риса. а, б — $\times 10\ 000$; в — $\times 27\ 000$; г — $\times 40\ 000$. Б — бактерия; М — митохондрия; КО — клеточная оболочка; К — капсула бактерии; ЭР — эндоплазматический ретикулум

1 % танниновой кислоты («Sigma», США) для контрастирования мембранного материала. После обезвоживания материал заключали в смесь смол эпон — аралдит («Fluka», Швейцария). Ультратонкие продольные срезы кусочков корней изготавливали на ультрамикротоме LKB-III («LKB», Швеция), снимали на однощелевые бленды, покрытые напыленной углем формваровой пленкой, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Материал анализировали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1200 EX («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 60 или 80 кВ на серийных срезах.

Результаты и обсуждение. На основе анализа материала, фиксированного для электронно-микроскопического исследования, выявлено, что в результате обработки зерновок риса эндифитными бактериями

K. oxytosa VN13 на поверхности клеток изученных корней находились многочисленные скопления бактерий (рис. 1, а, б). Количество бактерий вдоль поверхности корня значительно варьировало: наибольшая часть их популяции присутствовала в зоне апексов корней растений; при перемещении в базальном направлении обнаруживалось все мень-



Рис. 2. Локализация бактерий в клеточных оболочках: а — $\times 9000$, б — $\times 27\,000$; в — $\times 36\,000$; г — начальный этап лизиса клеточной оболочки бактериями, $\times 11\,000$

ше бактерий; на уровне зоны дифференцировки встречались лишь отдельные клетки.

На медянном продольном срезе бактерии имели цилиндрическую или узкоэллипсоидную форму (рис. 1, 2). Длина отдельных бактерий достигала 1,5—2,5 мкм, ширина — 0,4—0,8 мкм. Ограниченные мембранной оболочкой бактерии содержали мелкофибриллярный и мелкогранулярный матрикс с повышенной электронной плотностью, несколько разреженный в центре клеток и уплотненный на периферии. В центральной зоне клетки выявлялись электропрозрачные зоны бактериального нуклеоида, которые в некоторых местах пересекались фибриллами ДНК. В ряде случаев на срезах бактерий четко выделялись элек-

троноплотные гранулы, размеры которых варьировали. Такие включения напоминали карбоксисомы [10] и цианофициновые гранулы [11], которые были обнаружены в цианобактериях, находившихся в симбиозе с другими видами высших растений.

Характерной особенностью части популяции бактерий *K. oxytoca* VN13 было наличие капсулы, сформированной из тонких фибрилл (рис. 1, *г*). Внутренняя поверхность капсулы имела почти гладкие контуры, тогда как ее внешняя сторона была неровной за счет различного количества фибрилл, составляющих отдельные участки капсулы. Полость капсулы, как правило, была электропрозрачной и лишь в редких случаях в ней выявлялись отдельные включения, имеющие вид пузырьков. Специфическая текстура материала, из которого состояла капсула, была сходной с таковой соседней оболочки клетки корня. Последний факт позволяет предположить, что в состав оболочки капсулы входят целлюлозные микрофибриллы и, по всей вероятности, пектин.

Что касается локализации бактерий, то следует отметить, что они большей частью размещались на поверхности корней риса или внутри кортикальных клеточных оболочек (рис. 1, *а, б*). В зоне корневых апексов они были представлены как одиночными клетками, так и их скоплениями, которые насчитывали до 10 бактерий. Особый интерес представляли случаи присутствия бактерий в толще клеточных оболочек (рис. 1, *б; 2, а, б, г*). На рис. 2, *в*, видно внешнюю оболочку клетки корня риса, где расположена группа бактерий, часть которых тесно прилегает к оболочке, образуя в ней выпячивания. Внутри клеточных оболочек бактерии чаще всего занимали разреженную зону, которая формировалась, очевидно, в процессе лизиса срединной пластинки. Иногда такая зона была настолько широкой, что в ней помещались не только одиночные бактерии, но и их кластеры, состоящие из нескольких тесно прилежащих друг к другу прокариот (рис. 2, *г*). Такие клеточные оболочки были присущи только разрушенным клеткам наружного слоя корня, в которых клеточные компоненты были большей частью разрушены.

Доказательства, представленные в этой работе, свидетельствуют о том, что полисахариды оболочки клеток корней хозяина при контакте с бактериями подвергаются лизису. Это согласуется с ранее полученными данными для несимбиотических диазотрофов, показавшими, что перибактериоидное пространство содержит ряд лизосомных ферментов, вырабатываемых бактериями, которые способны гидролизовать пектин и целлюлозу [9]. Согласно определителю Берги [12], вид *K. oxytoca* отличается от других видов рода *Klebsiella* способностью гидролизовать пектат, что и было подтверждено для изолята VN13 при идентификации его до вида (данные будут опубликованы). По-видимому, присутствие капсул вокруг бактерий можно объяснить, с одной стороны, рыхлостью оболочек наружного слоя клеток корня, что позволяет отделиться их небольшим фрагментам за счет работы ферментов, выделяемых соседними бактериями, и, с другой стороны, относительно слабым гидролизом полисахаридов. Последнее, возможно, связано со сниженной активностью гидролитических ферментов и/или их недостаточной выработкой у инкапсулированных бактерий. Не исключена также возможность стимулирования клеткой корня, подвергнувшейся бактериальной инвазии, ресинтеза нового слоя клеточной оболочки в месте внедрения бактерии, в процессе которого закрывалась полость капсулы.

Полученные данные о локализации бактерий в кортикальном слое клеток корней двухнедельных проростков риса и лизисе их клеточных стенок полностью подтверждают сведения Рейнгольд-Гурека и Гурека [9] об эндофитной ассоциации *Azoarcus* sp.—рис на стадии двухнедельного проростка.

Анализ приведенных выше результатов позволяет высказать предположение о том, что присутствие бактерий в наружном слое клеток и их способность преодолевать наружную клеточную оболочку могут обуславливаться особыми химическими свойствами и составом погра-

ничного слоя корня, покрытого слизью, где, очевидно, имеются благоприятные условия для развития популяции бактерий и действия их гидролитических ферментов. Такое предположение позволяет, хотя бы частично, объяснить наблюдаемый градиент распределения популяции бактерий вдоль корня, снижающийся от апекса к основанию корня, что позитивно коррелирует с градиентом распределения слизи в том же направлении.

На основании проведенных нами электронно-микроскопических исследований взаимодействия данного вида микроорганизмов с корнями двухнедельных проростков риса можно выделить следующие фазы в существовании такой ассоциации: 1) контакт отдельных бактерий или их кластеров с оболочками поверхностного слоя клеток корней; 2) гидролиз клеточных оболочек и проникновение в клетку хозяина. Учитывая естественность процесса отмирания и обновления клеток поверхностного слоя корней проростков риса, а также стимулирующий эффект *K. oxytoca* VN13 на развитие риса, мы не склонны делать вывод об отмирании клеток вследствие бактериальной инфекции. По-видимому, ферментативный аппарат, позволяющий бактериям проникать внутрь отмирающих клеток, способствует использованию их в качестве депо и постоянно, в течение всего вегетационного периода растения, колонизировать поверхность корня. Подтверждением последнего могут служить данные, полученные нами в полевых экспериментах для ассоциации *K. oxytoca* VN13 — ячмень [13].

Н. О. Белявська, Н. О. Козировська, Л. О. Кучеренко, Е. Л. Кордюм, В. А. Кордюм

ВЗАЄМОВІДНОСИНИ БАКТЕРІЙ РОДУ *KLEBSIELLA* З РОСЛИНОЮ.

1. ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ ЕНДОФІТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ З КОРЕННЯМИ ПРОРОСТКІВ РИСУ

Резюме

За допомогою електронної мікроскопії досліджували локалізацію *Klebsiella oxytoca* VN13 в коренях рису, а також їх взаємодію. Ці дослідження, по-перше, свідчать про локалізацію бактерій у слизу на поверхні коренів і в периферійних кореневих клітинах та про зростання їх кількості від базального до апікального кінців кореня; по-друге, вказують на те, що проникнення цих бактерій до клітин хазяїна відбувається шляхом гідролізу оболонок клітин коренів ферментами бактерій; по-третє, дозволяють припустити, що вплив бактеріальної інвазії обмежується периферійним шаром клітин коренів двотижневих проростків рису.

Н. О. Belyavskaya, N. O. Kozirovskaya,
L. O. Kucherenko, E. L. Kordyum, V. A. Kordyum

INTERRELATIONS OF THE *KLEBSIELLA* GENERA WITH THE PLANT.

I. ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS INTERRELATIONSHIP WITH RICE SEEDLING ROOTS

Summary

The localization of *Klebsiella oxytoca* VN 13 in rice roots and the patterns of their interrelationships have been investigated by electron microscopy. These studies demonstrated that bacteria were localized in a slime on a surface of roots and in peripheral root cells and that their number increased from basal edge to distal one of a root (1); indicated that penetrations of bacteria into host cells occurred through the root cell wall hydrolysis with bacterial enzymes (2); suggested that the effect of the bacterial invasion was restricted with the peripheral layer of root cells in the two-week rice seedlings (3).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Patriquin D. C., Dobereiner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil // Can. J. Microbiol.— 1978.— 24, N 6.— P. 734—742.

2. McClung C. R., Patriquin D. C. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel // *Ibid.*—1980.—26, N 8.—P. 881—886.
3. Bilal R., Malik K. A. Isolation and identification of N₂-fixing *Zooglyea*-forming bacterium from Kallar grass histoplane // *J. Appl. Bacteriol.*—1987.—62, N 2.—P. 289—294.
4. Reingold B., Hurek T., Fendrik I. Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of Kallar grass // *Appl. Environ. Microbiol.*—1987.—53, N 4.—P. 889—891.
5. Baldani J. I., Baldani V. L. D., Sedlin L., Dobereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1986.—36, N 1.—P. 86—93.
6. Нгуен Т. Н. Х., Тон Т. Н. Б., Тарасенко В. А., Козыровская Н. А. Азотфиксирующие бактерии колонизируют ксилему корня риса // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 2.—С. 97—99.
7. Dobereiner J., Reis V. M., Paula M. A., Olivares F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants // *New horizons in nitrogen fixation: Proc. 9th Int. Congr. on nitrogen fixation (Cancun, 6—12 Dec., 1992).*—Mexico, 1993.—P. 671—675.
8. *Ecology of nitrogen fixation* / Ed. W. J. Broughton.—Oxford: Univ. press, 1981.—278 p.
9. Reingold-Hurek B., Hurek T. Capacities of *Azoarcus* sp., a new genus of grass-associated diazotrophs // *New horizons in nitrogen fixation: Proc. 9th Int. Congr. on nitrogen fixation (Cancun, 6—12 Dec. 1992).*—Mexico, 1993.—P. 691—694.
10. Johansson C., Bergman B. Early events during the establishment of the *Gunnera* / *Nostoc* symbiosis // *Planta.*—1992.—188, N 3.—P. 403—413.
11. Callahan D. A., Torrey J. J. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium* // *Can. J. Bot.*—1981.—59, N 9.—P. 1647—1664.
12. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / Ed. B. Tansile.—Baltimore; London: Williams and Wilkins, 1984.—Vol. 1.—P. 464.
13. Kozyrovska N., Alexeyev M., Kovtunovych G. et al. Bioluminescence-based detection of *Klebsiella oxytoca* VN 13 in the environment // *Biopolymery i klityna.*—1994.—10, N 2.—P. 19—24.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев
Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

Получено 10.05.94