

**Ю.А. Гончар, Е.В. Надкерничная, И.В. Волкова**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
ул. Шевченко, 97, г. Чернигов, Украина, 14027

## **ФОРМИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО СИМБИОЗА АЗОСПИРИЛЛ С РАСТЕНИЯМИ ШЕЛКОВИЦЫ**

*С использованием абиогенного фактора нодуляции (2,4-дихлорофеноксиацетата) получены параклубеньки на корнях растений шелковицы. Для изучения способности бактерий рода *Azospirillum* заселять данные новообразования была получена штаммоспецифичная антисыворотка к штамму *Azospirillum brasilense* 54. Установлено, что азоспириллы способны проникать в параклубеньки растений шелковицы, выращенных в пробирках на стерильной среде и в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** *Azospirillum brasilense*, шелковица, параклубеньки, антисыворотка.

Клубеньки на корнях небобовых растений образуются у ряда культур: ольхи, облепихи, восковника, кориарии, кукурузы, вейника, осоки, подмаренника и т.д. под воздействием биогенных и абиогенных факторов нодуляции [1-7]. Бактерии, которые способны проникать в корни растений и индуцировать образование клубеньков, адсорбируются на поверхности корней растений, синтезируют гормоноподобные вещества и ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, а также проникают во внутренние ткани кортикальной паренхимы и распространяются по системе межклетников [8, 9]. В клубенькоподобные структуры могут проникать различные микроорганизмы, в том числе и патогенные [10]. Для увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур предпринимаются попытки искусственно индуцировать образование клубеньков, одновременно заселяя их азотфиксирующими бактериями. Исследовано искусственное образование псевдоклубеньков на корнях капусты и рапса под воздействием разнообразных нодулирующих агентов при одновременной инокуляции азотфиксирующими микроорганизмами [11, 12].

В Институте шелководства обнаружен феномен гигантизма растения шелковицы. На корнях исследуемого растения обнаружили большое количество клубенькоподобных утолщений [13]. Было установлено, что данные структуры характеризуются высокой азотфиксирующей активностью, сравнимой с нитрогеназной активностью клубеньков бобовых. Из клубеньков на корнях шелковицы были выделены азотфиксирующие бактерии: *Agrobacterium radiobacter* и *Azospirillum brasilense*.

Бактерии рода *Azospirillum* привлекают внимание многих исследователей вследствие их способности развиваться как в ризоплане и ризосфере, так и проникать в корковые ткани корней [14, 15].

Цель работы: искусственно индуцировать образование клубеньков на корнях растений шелковицы и заселить их активными штаммами diaзотрофов.



## Материалы и методы

Для получения антисыворотки был выбран наиболее эффективный штамм азоспирилл - *Azospirillum brasilense* 54. В условиях лабораторного опыта стерильные проростки шелковицы, выращенные в пробирках на полужидкой среде, инокулировали исследуемым штаммом при одновременной обработке семян 2,4-дихлорофеноксиацетатом в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  г действующего вещества на 1 растение. Явление паранодуляции изучали также в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве. Через 30 дней для дальнейших исследований параклубеньки семян шелковицы стерилизовали раствором сулемы и 96% этиловым спиртом, многократно промывали стерильной водой. В стерильных условиях параклубеньки раздавливали стеклянной палочкой и производили посев на чашки с картофельной агаризованной средой и средой Касераса. Для дальнейших исследований отбирали колонии азоспирилл по характерным культурально-морфологическим признакам.

Антитела получали, используя модифицированную схему иммунизации кролей целыми клетками *Azospirillum brasilense* 54, поверхность которых была предварительно обработана глутаровым альдегидом. В качестве адъюванта использовали мантанид ISA 25. Инъекцию проводили 2 мл антигена с оптической плотностью  $D_{660} = 1,3$  (при длине волны света 660 нм) в кювете толщиной 1 см, что соответствует концентрации примерно  $3 \times 10^{10}$  кл/мл. Схема иммунизации включала 6 инъекций, которые проводили с интервалом в 3 дня. В нашей модификации инъекции проводили, чередуя подкожное введение антигена в область шеи с внутривенной инъекцией в 5 - 7 точек вдоль позвоночника. Титр антител в реакции двойной иммунодиффузии составил 1:8 и  $3 \times 10^3$  в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА). Через 40 дней проводили реиммунизацию, которая включала 3 инъекции с недельным интервалом: 1-я — внутримышечная, 2-я и 3-я — внутривенные, возрастающим количеством антигена (от  $3 \times 10^{10}$  до  $3 \times 10^{12}$  кл/мл). Кровь отбирали через 10 дней после завершения иммунизации. Консервирование сыворотки проводили борной кислотой (2 г на 100 мл сыворотки).

Для постановки реакции преципитации по Оухтерлони [16] использовали 1 % агарозу на физиологическом растворе с добавлением борной кислоты (10 мг/мл) [17]. Расплавленный агар разливали тонким слоем на покровные стёкла. В нём вырезали 2 ряда лунок диаметром 3 мм: 5 — сверху и 6 — внизу на расстоянии 5 мм одна от другой. Для наблюдения реакции преципитации между антигеном и полученной сывороткой лунки наполняли пастеровскими пипетками с оттянутыми концами: верхний ряд — раствором антигена, а нижний — растворами антител с титром 1:16 (3 левые лунки) и 1:32 (3 правые лунки). Стёкла помещали в чашки Петри и ставили в эксикатор с налитой на дно водой. Реакцию проводили в термостате при температуре 37 °С. Линии преципитации учитывали через 2 дня визуально. Препараты окрашивали красителем кумасси R-250.

Иммуноферментный анализ (ТИФА) проводили на полистироловых планшетах фирмы Sarstedt USA в непрямом варианте. Для сенсibilизации лунок планшеты бактериальными антигенами проводили сорбцию белков в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере при 4 °С в течение 14-16 часов. Специфическую сыворотку кроля (разведение 1:1000) и антикроличий пероксидазный конъюгат инкубировали 60 минут при 37 °С. Субстрат/хромогенным раствором в ТИФА служил  $H_2O_2$ /ортофенилендиамин. Оптическую плотность определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 492 нм. При анализе отобранных образцов в качестве положительного контроля исполь-



зовали бактериальный антиген *A. brasilense 54*, а в качестве отрицательного — бактериальный антиген *A. brasilense Sp7*. Все образцы стандартизировали по концентрации белка — 25 мкг/мл.

Определяли отношение оптической плотности (ОП) положительного контроля к ОП отрицательного контроля. В случае, если его значение превышало 2, принадлежность исследуемых бактериальных штаммов к маркерному считалась доказанной.

### Результаты и их обсуждение

На корнях стерильных проростков шелковицы, обработанных 2,4-дихлорофеноксиацетатом при одновременной интродукции бактерий *A. brasilense 54* в корневую зону растений, на 10-14 сутки образовывались параклубеньки округлой формы (рис. 1).

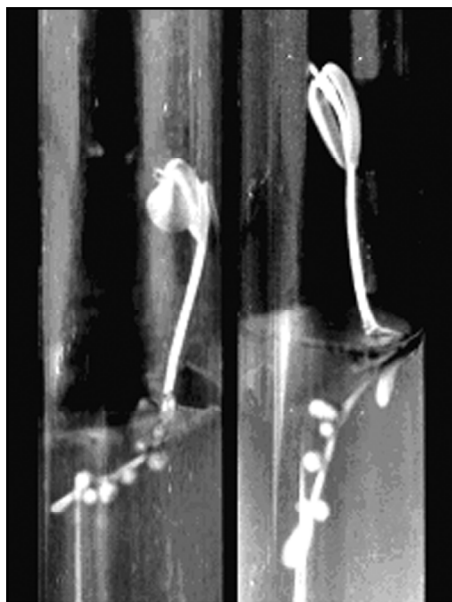


Рис. 1. Влияние 2,4-Д и инокуляции азоспириллами на проростки шелковицы

На корнях сеянцев шелковицы, выращенных в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве и обработанных 2,4-Д при инокуляции азоспириллами, крупные клубеньки образовывались ниже корневой шейки и вдоль главного корня, более мелкие — на нижней части тонких молодых корней (рис. 2).

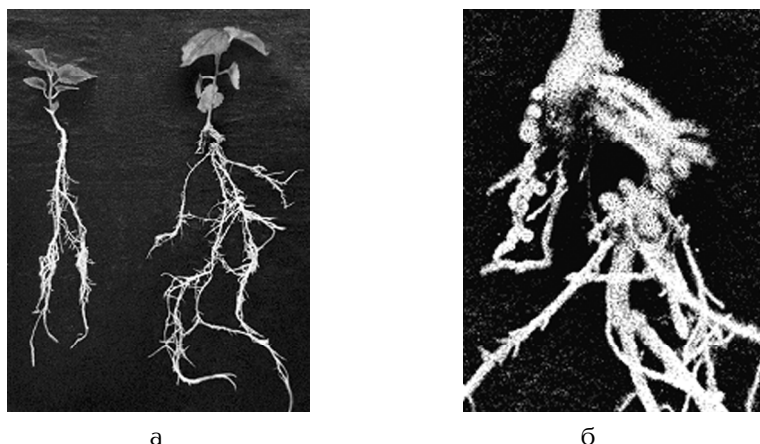


Рис. 2. Параклубеньки на корнях сеянцев шелковицы  
 а: зліва — контрольное растение, справа — растение шелковицы, корневая система которого была обработана 2,4-Д при одновременной инокуляции бактериями *A. brasilense 54*;  
 б: увеличенный фрагмент корня сеянца шелковицы с параclubеньками

При интродукции diaзотрофов в параclubеньки, полученные с помощью абиогенного фактора нодуляции, азотфиксирующая активность бактерий в данных структурах сохраняется не всегда. Результаты определения азотфиксирующей активности параclubеньков шелковицы свидетельствуют в пользу того, что нитрогеназная активность параclubеньков, полученных при инокуляции растений штаммами азоспирилл в 17,2 раза превосходила активность параclubеньков, которые образовывались на корнях сеянцев вследствие обработки их только 2,4-Д (табл.1).

Таблица 1

**Нитрогеназная активность параclubеньков на корнях сеянцев шелковицы в результате обработки корневой системы 2,4-дихлорофеноксиацетатом и азоспириллами**

Варианты опыта	Нитрогеназная активность параclubеньков, мкг N на 1 растение за час
Обработка 2,4-Д	0,22
Обработка 2,4-Д и <i>A. brasilense 54</i>	3,79
НСР <sub>05</sub>	0,58

Из параclubеньков были выделены изоляты, не отличающиеся по культурально-морфологическим признакам между собой и соответствующие по данным признакам штамму *Azospirillum brasilense 54*.

Применение модифицированной схемы иммунизации животных и реиммунизация позволила получить антисыворотку к штамму *Azospirillum brasilense 54* с титром 1:32 в реакции преципитации и  $4 \times 10^5$  — в реакции



ТИФА, достаточном для решения поставленных задач.

Анализируя данные двойной иммунодиффузии в геле, мы установили, что все изоляты, выделенные из параклубеньков шелковицы, соответствуют штамму *Azospirillum brasilense 54* (рис. 3).

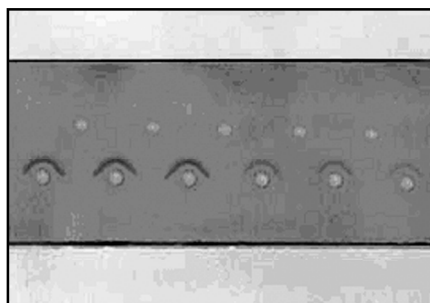


Рис. 3. Полосы преципитации между сывороткой (разведения: 1:16 и 1:32) и антигеном (изолят из клубеньков шелковицы)

Результаты двумерной иммунодиффузии в геле и ТИФА согласуются между собой и свидетельствуют о том, что из 3-х изолятов, выделенных из параклубеньков шелковицы, все три обеспечили положительную реакцию в ТИФА и образование линий преципитации со штаммоспецифичной анти-сывороткой (табл. 2).

Таблица 2

**Результаты иммунодиффузии и иммуноферментного анализа изолятов бактерий, выделенных из параклубеньков семян шелковицы**

Образцы	ТИФА		Иммунодиффузия в геле
	ОП, 492 нм	ОП образца/ ОП обр. контроля*	
Положительный контроль ( <i>A. brasilense 54</i> )	2,984	4,76	+++
Отрицательный контроль ( <i>A. brasilense Sp7</i> )	0,627	1,0	-
Изолят №1	2,791	4,45	+++
Изолят №2	2,847	4,54	+++
Изолят №3	2,096	3,34	++

\* Соотношение ОП исследуемого образца к ОП отрицательного контроля.

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют, что изучение серологических свойств бактерий может быть использовано для выяснения механизма контактных взаимодействий микроорганизмов с растениями, а также для надёжной и быстрой идентификации штаммов азоспирилл, выделенных из параклубеньков растений.

Таким образом, нами получены параклубеньки с высокой нитрогеназной активностью на корнях семян шелковицы в результате обработки абиогенным агентом нодуляции – 2,4-дихлорофеноксиацетатом при одно-

временной инокуляции азоспириллами. Используя модифицированную нами схему иммунизации кролей, мы получили штаммоспецифичную антисыворотку с титром 1:32 в реакции преципитации, что позволило использовать её для доказательства проникновения бактерий *Azospirillum brasilense* 54 в параклубеньки, искусственно индуцированные на корнях шелковицы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Надкерничная Е.В., Мамчур А.Е., Лохова В.И. Образование клубеньков на корнях моркови, инокулированной азоспириллами // Микробиол. журн. — 1989. — Т. 51, №5. — С. 11–16.
2. Krol M. J., Kobus J., Fuk B. Wiazanie azotu w parabrodawkach korzeni zboz przez *Azospirillum* lip. i Acin. — like // Zezz. Nauk. Pol. / AR Szczecinie. — 1997. — № 68. — С. 153–161.
3. Nie Y.F. Nitrogen fixation in 2,4-D forced associative wheat-diazotroph system. // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. — Saratov, 1995. — P. 32–34.
4. Майстренко Г.Г. Симбиоз у небобовых древесных растений на примере облепихи // Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов. — Н.: Наука, 1977. — С. 17–55.
5. Burgess D., Peterson R.I. Development of alnus japonica root nodules after inoculation with Frankia strain HFPAr<sub>3</sub> // Can. J. Bot. — 1987 — Vol.65, № 8. — P. 1647–1657.
6. Рогынюк И.С., Клевенская И.Л. Симбиотическая фиксация азота травянистыми растениями Сибири // Проблемы сибирского почвоведения. — 1977. — С. 200–213.
7. Рогынюк И.С., Клевенская И.Л. Азотфиксирующие системы с участием клубеньковых бактерий небобовых растений // Тез. докл. VI съезда Всесоюз. микробиол. о-ва. — Рига, 1980. — Т.5. — С. 47–48.
8. Емцев В.Т., Чумаков М.И. Критерии ассоциативности для бактерий, находящихся в диазотрофном биоценозе с небобовыми растениями // Микробиол. журн. — 1988. — Т. 50, №3. — С. 93–102.
9. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация: проблемы и перспективы // Бюл. ВНИИСХМ. — 1985. — №42. — С. 9–13.
10. Zinniel D. K., Lambrecht P., Harris N. B. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol.68, № 5. — P. 2198–2208.
11. Ковальская Н.Ю., Лобакова Е.С., Умаров М.М. Формирование искусственного азотфиксирующего симбиоза у растений рапса (*Brassica Napus* Var. *Napus*) в нестерильной почве // Микробиология. — 2001. — Т. 70, №5. — С. 701–708.
12. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Umarov M.M. Nodule - like structures formation by nitrogen-fixing *Pseudomonas caryophylli* strain on rape roots // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. — Saratov, 1995. — P. 18.
13. Пилипенко Б.Ф., Мальцева Н.Н., Надкерничная Е.В., Сальник В.П. Азотфиксирующие клубеньки на корнях шелковицы // Микробиол. журн. — 1996. — Т. 58, №5. — С. 93–95.
14. Bashan B.Y., Levanony H., Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // J. Gen. Microbiol. — 1986. — Vol.132, № 11. — P. 3069–3073.
15. Magalhaes F.M.M., Patriquin D., Dobereiner J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. // Rev. Brazil. Biol. — 1979. — Vol.39, № 3. —



P. 587–596.

16. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion // Acta pathol. et microbial. Scand. – 1953 – Vol.32, № 2. – P. 231–240.

17. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 304 с.

**Ю.А. Гончар, О.В. Надкернична, І.В. Волкова**

Інститут сільськогосподарської мікробіології УАНН, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

### **ФОРМУВАННЯ ШТУЧНОГО СИМБІОЗУ АЗОСПИРИЛ З РОСЛИНАМИ ШОВКОВИЦІ**

#### **Реферат**

З використанням абіогенного чинника нодуляції (2,4-дихлорфеноксиацетату) отримані парабульбочки на коренях рослин шовковиці. Для вивчення здатності бактерій роду *Azospirillum* заселяти дані новоутворення була отримана штамоспецифічна антисироватка до штаму *Azospirillum brasilense* 54. Установлено, що азоспірили здатні проникати у парабульбочки рослин шовковиці, які були вирощені у пробірках на стерильному середовищі і в умовах вегетаційного дослідження на нестерильному ґрунті.

**К л ю ч о в і с л о в а:** *Azospirillum brasilense*, шовковиця, парабульбочки, антисироватка

**Yu.A. Gonchar, E.V. Nadkernichnaya, I.V. Volkova,**

Institute of agricultural microbiology, Shevchenko str., 97, Chernigov, 14027, Ukraine

### **FORMATION OF ARTIFICIAL SYMBIOSIS AZOSPIRILLUM WITH MULBERRY TREES**

#### **Summary**

Using the abioogenous factor of modulation (2,4-dichlorophenocsyacetata) there were received the tubercles on the roots of mulberry trees. For investigation of the ability of bacteria of genus *Azospirillum* to inhabit the given new growth it has been received the strainspecific antiserum to strain *Azospirillum brasilense* 54. It was revealed that azospirilles are capable to penetrate into tubercles of the mulberry trees grown up in the test tubes on the sterile medium and under the conditions of vegetative experience on the nonsterile soil.

**К e y w o r d s:** *Azospirillum brasilense*, a mulberry tree, the tubercles, antiserum.

