

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В.ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи

ЛОБАКОВА Елена Сергеевна

**АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
РАСТИТЕЛЬНЫХ СИМБИОЗОВ**

03.00.12 - физиология растений

03.00.24 - микология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва - 2004

**ОБЯЗАТЕЛЬНЫЙ
БЕСПЛАТНЫЙ
ЭКЗЕМПЛЯР**

Работа выполнена на кафедре физиологии микроорганизмов биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Ю.Т. Дьяков

доктор биологических наук, профессор Г.М. Зенова

доктор биологических наук Г.Л. Шапошников

Ведущая организация: Институт физиологии растений РАН ям. К.А. Тимирязева

Защита состоится "29" октября 2004 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного Совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Воробьевы горы, МГУ, биологический факультет, ауд М-1, тел/факс (095) 939 43 09

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан " _____ " _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



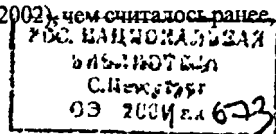
М.А. Гусаковская

Актуальность проблемы. Симбиозы растений с микроорганизмами известны уже несколько столетий и широко использовались людьми в практической деятельности еще задолго до выяснения природы этого явления. В последнюю четверть 20-го века открытие новых групп симбиозов и расширение видовой принадлежности хозяев, формирующих симбиозы с микроорганизмами, указывает на то, что данное явление не исключение в природе, а скорее правило. С середины 80-х годов прошлого столетия изучением симбиозов занимается самостоятельная область биологии - симбиология (Левин, 1983; Маргелис, 1986; Проворов, 2001; Smith, 1992; Douglas, 1994). Основными ее направлениями являлись изучение: 1) роли симбиоза в эволюции клетки и возможности образования новых симбиозов в природе *de novo*; 2) специфичности взаимоотношений партнеров; 3) особенностей взаимодействий макро- и микросимбионтов на генетическом и биохимических уровнях; 4) сопряженной эволюции взаимодействующих видов как совокупности процессов макро- и микроэволюции симбиотических систем. В 90-е годы в рамках симбиологии, благодаря успехам клеточной биологии и разработки методологической базы исследований - введении клеток многоклеточных организмов в тканевые, клеточные культуры, успешное их длительное культивирование в контролируемых условиях эксперимента, получение протопластов, создании модельных ассоциаций различных типов при введении во все эти объекты клеток прокариотных и эукариотных микроорганизмов, возникает новое направление - экспериментальная симбиология (Корженевская, 1990).

В последнее десятилетие происходит смена парадигмы симбиоза. На смену представлению о симбиозах как о двухкомпонентных системах приходит понимание их как многокомпонентных систем, в которых, помимо доминантного микросимбионта участвуют несколько ассоциативных симбионтов. Ассоциативные микросимбионты, часто присутствующие на всех стадиях развития макросимбионта, играют значительную роль в формировании, стабильном существовании и продуктивности симбиоза в целом. В связи с этим изменяется взгляд на давно известные и ставшие уже классическими симбиозы растений с бактериями сем. Rhizobiaceae, актиномицетами рода *Frankia* и микоризными грибами. В настоящее время среди ассоциативных микросимбионтов выделена группа эндофитных бактерий и грибов, способных колонизировать внутренние ткани различных органов растений (Каратыгин, 1994; Dobereiner, 1983; Dobereiner et al., 1995; Asmuss et al., 1995). Эти микросимбионты оказывают более выраженное позитивное влияние на рост растения-хозяина за счет компартментации внутри тканей растений.

В силу того, что в последнее десятилетие для других известных растительных симбиозов открыты новые многочисленные сопутствующие микроорганизмы, назрела необходимость в выявлении и понимании роли таких ассоциативных микроорганизмов симбионтов в функционировании симбиоза в целом.

В последние годы большое внимание исследователей привлекают симбиозы высших растений с цианобактериями (синцианозы), о чем свидетельствует выход в свет с интервалом всего в 12 лет двух международных коллективных монографий (Rai, 1990; Rai et al., 2002). Это связано, с пониманием существенно более значительной биосферной роли синцианозов в фиксации молекулярного азота (Carpenter, 2002; Osborne, Carpenter, 2002), чем считалось ранее.



а также с нарастающей актуальностью проблемы «биологического азота» путем расширения круга сельскохозяйственных растений, которые могли бы удовлетворить свою потребность в азоте за счет симбиотической азотфиксации (Hartem, 2001; Rai et al., 2002; Rai, Bergman, 2002). В отличие от других симбиозов растений с азотфиксирующими прокариотами - клубеньковыми бактериями и актиномицетами рода *Frankia* - цианобактерии формируют различные типы симбиозов (по степени зависимости партнеров - облигатные, факультативные; по характеру локализации микросимбионта - поверхностные, внутритканевые, внутриклеточные; по метаболическим функциям цианобактерии в составе симбиоза - фототрофного или diaзотрофного компонента) с представителями не только покрытосеменных растений, а также с печеночными и сфагновыми мхами, папоротниками, голосеменными растениями (Stewart et al., 1983; Schenk, 1994).

В последнее десятилетие активно обсуждается вопрос о трехкомпонентности симбиоза папоротника *Azolla* с азотфиксирующей цианобактерией *Anabaena azollae* и бактериями рода *Arthrobacter* (Gates et al., 1986; Fornii et al., 1990, Carapicco, 1991; Carapicco et al., 1999; Lechno-Yossef, Nierzwicki-Bauer, 2002). Однако к настоящему времени высказаны только предположения о составе ассоциативных бактерий и их функциях в составе данного симбиоза (Bergman et al., 1993; Lechno-Yossef, Nierzwicki-Bauer, 2002). В литературе - сделаны первые шаги в отношении обобщения данных о наличии в составе растительных синцианозов бактерий, и предприняты попытки объяснения их присутствия, а в отношении симбиоза реликтовых саговниковых растений такие данные вовсе отсутствуют.

Несмотря на всплеск новой волны исследований синцианозов многие вопросы регуляции их формирования и стабильности *in situ* до сих пор остаются невыясненными (Rai, 2002). Неизвестны механизмы, индуцирующие: 1) образование у компетентных видов цианобактерии подвижных гормогониев; 2) направленное их движение к специализированным структурам растений; 3) их проникновение внутрь тканей и заселение предсуществующих полостей, межклетников и/или клеток микросимбионта; 4) остановку последующего распространения цианобактерии внутри тканей растения; 5) внутритканевое поведение цианобактерий - дифференцировку гетероцист и/или акинет, регуляцию их численности и жизнеспособности.

Высказываются предположения, что в качестве веществ, регулирующих взаимоотношения между растением и цианобактериями в синцианозах могут выступать фенольные соединения (Bergman et al., 1996; Adams, 2000; Cohen, Yamasaki, 2000; Elhai, Meeks, 2002) - наиболее распространенные в растениях "вторичные соединения", функции которых многообразны (Запрометов, 1993). Фенольные соединения часто играют роль сигнальных молекул при индукции формирования большинства растительных симбиозов с микроорганизмами (Shirley, 1995; Overholt et al., 1996). В качестве сигнальных веществ могут выступать различные представители фенольного метаболизма - производные оксибензойных и оксикоричных кислот, однако, чаще всего они представлены различными флавоноидами: флавонами, флавоионами, флавонолами (Phillips, 1992; Запрометов, 1996). Считается, что они играют большую роль как на этапах дистантного узнавания, так и контактного взаимодействия: адгезии и прикрепления не только доминантных (Xie et al., 1995; Lindstrom et al., 2002), но и ассоциативных микросимбионтов (Каме-

нева, Муронец, 1999; Smith, Douglas, 1987; Douglas, 1994). Однако до настоящего времени представления о роли этих веществ в формировании растительных симбиозов с различными группами микроорганизмов фрагментарны.

Цель работы — выяснение закономерностей организации и функционирования ассоциативных комплексов микросимбионтов в природных растительных симбиозах и модельных ассоциациях с культивируемыми тканями *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Изучение таксономического состава и структуры ассоциативных комплексов микросимбионтов (АКМ) ризосферы и ризопланы на примере апогеотропных корней саговниковых растений, папоротников рода *Azolla*, корней эпифитных орхидей.
2. Исследование свойств ассоциативных микроорганизмов и цианобионтов АКМ саговниковых растений и папоротников рода *Azolla* при взаимодействии с растениями в симбозе *in vivo* и модельных ассоциациях с культивируемыми тканями *in vitro*.
3. Выяснение особенностей накопления и локализации фенольных соединений в апогеотропных корнях саговниковых растений и определение их роли в формировании и стабильном существовании симбиоза саговниковых растений и АКМ.
4. Изучение роли бора в стабилизации структур оболочек гетероцист у азотфиксирующих цианобактерий в модельных системах *in vitro* и растительных синцианозах *in vivo*.
5. Изучение возможности получения искусственных ассоциаций интактных растений с АКМ. Разработка условий получения псевдоклубеньков на корнях несимбионтрофных видов под действием АКМ.

Научная новизна работы. В рамках симбиологии предложено новое направление исследований - ассоциативная симбиология, определяющая многокомпонентный состав участвующих в формировании симбиоза микроорганизмов с различными функциями: традиционного известного доминантного партнера, от которого зависит успех симбиоза на метаболическом уровне, и сопутствующих минорных компонентов, существующих в составе комплекса с доминантным симбионтом, и выполняющих функции, обеспечивающие успех доминантного симбионта и симбиоза в целом.

Впервые проведено изучение структуры многокомпонентных ассоциативных комплексов микросимбионтов в ризосфере и ризоплане апогеотропных корней 7 видов саговников. Созданы коллекции ассоциативных бактобионтов, микромицетов и цианобионтов включающие, 250,20 (доминантов ризосферы и ризопланы) и 10 культур соответственно. Доказано, что только азотфиксирующие цианобактерии являются доминантным внутритканевым симбионтом, а бактерии и грибы заселяющие поверхность и ризоплану кораллоидных корней, являются ассоциативными микросимбионтами. Обосновано представление о том, что в процессе эволюции адаптационная амплитуда реакций саговниковых реликтовых растений, определяющая их сохранение, связана с функционированием в специализированных органах растений, апогеотропных корнях, эффективной симбиотической системы, включающей доминантный микросимбионт - азотфиксирующие цианобактерии - и широкий спектр ассоциативных бактерий и грибов. Уста-

новлено, что ассоциативные микроорганизмы апогеотропных корней участвуют в деструкции растительных клеточных стенок и, следовательно, способствуют заселению их доминантным микросимбиотом - азотфиксирующими цианобактериями.

Впервые охарактеризован комплекс растворимых фенольных соединений боковых, преколлоидных и кораллоидных корней саговников. Изучены накопление и локализация растворимых фенольных соединений в апогеотропных корнях представителей 7 родов саговниковых растений. Показано, что максимальное количество фенольных соединений накапливается в базальной части корней, где отсутствуют жизнеспособные формы цианобионтов. Установлено, что ассоциативные микросимбиоты ризосферы и ризопланы апогеотропных корней (бактерии и грибы) обладают разной устойчивостью к синтезируемым кораллоидными корнями фенольным соединениям. Впервые установлены закономерности в распределении микросимбиотов в апогеотропных корнях саговниковых растений, согласующиеся с накоплением и локализацией в них фенольных соединений. Доказано, что качественный состав фенольных экстрактов апогеотропных корней саговников влияет на процессы клеточной дифференции цианобактерий: в модельных системах стимулирует или ингибирует дифференцировку подвижных гормогониев, акинет, появление популяции клеток с редуцированной клеточной стенкой - протопластов и сферопластов.

Для растительных синцианозов предложена гипотеза о регуляторном действии бора и фенольных соединений в структурно-морфологическом и физиолого-биохимическом взаимодействии партнеров.

Впервые для получения на корнях несимбиотрофных видов растений (рапса, табака, риса, паслена) использованы АКМ, выделенные из природных синцианозов саговниковых растений и папоротников рода *Azolla*. Полученные данные свидетельствуют о том, что псевдо клубеньки являются благоприятной эконишей для развития и активного функционирования diaзотрофных микроорганизмов.

Научно-практическая ценность. Полученные результаты имеют, прежде всего, теоретическое значение, расширяющее наши представления о процессах формирования, стабильном существовании растительных природных и экспериментально полученных азотфиксирующих симбиозах, регуляции метаболизма симбиотических и ассоциативных бактерий под влиянием метаболитов растений. Разработан новый подход получения стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с азотфиксирующими микроорганизмами. Полученные экспериментальные данные могут служить основанием для внедрения данного способа улучшения питания экологически чистым «биологическим азотом» ценных видов растений в практику сельского хозяйства.

Результаты исследований по изучению ассоциативных комплексов микросимбиотов в природных и экспериментальных растительных симбиозах (синцианозах) включены в руководства "Handbook of symbiotic cyanobacteria" (CRC Press, 1990) и "Symbiotic cyanobacteria" (Kluwer Academic Press, 2002), внедрены в задачи малого и большого практикума по физиологии микроорганизмов, летней практики по природным симбиозам биологического факультета

для студентов кафедры физиологии микроорганизмов Биологического факультета МГУ и студентов Берлинского университета им. Гумбольдтов, в лекционные курсы по симбиологии, клеточной физиологии (кафедра физиологии микроорганизмов, Биологический факультет МГУ), микробиологии (кафедра биологии почв факультета Почвоведения МГУ), используются в научной работе секции Биологии (кафедра физиологии растений) Берлинского университета им. Гумбольдтов, о чем имеются соответствующие акты.

В диссертации использованы данные, полученные лично автором, а также под его руководством в работах студентов и аспирантов или при непосредственном участии. Соискателю принадлежат: разработка программы исследований, сбор экспериментального материала, обобщение литературных данных, теоретическое обобщение полученных результатов, выводы из работы.

Апробация работы. По материалам диссертации автором сделаны 30 докладов на Всесоюзных, Республиканских и Международных съездах и конференциях, в том числе:

Всесоюзные конференции: «Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями» (Пушино, 1988; 1989), «Физиолого-биохимические и ультраструктурные исследования лишайников в СССР» (Ленинград, 1989), IV съезде Физиологов растений (1999, Москва), к 110-летию со дня рождения проф. Е. Е. Успенского «Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов» (Москва, 2000), «Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках» (С-Пб, 2001), Физиология растений и экология на рубеже веков (Ярославль, 2003); V съезде Физиологов растений (2003, Пенза); VI симпозиуме по фенольным соединениям (2004, Москва). Международные конференции и симпозиумы: VII Int. Cong. "On Plant and Cell Cultures" (1990, Amsterdam); "Int. Symbiosis Cong." (1991, Jerusalem); «Современные проблемы альгологии и фитопатологии» (1998, Москва), «По анатомии и морфологии растений» (2002, С-Пб); к 70 и 75-летию со дня рождения академика РАН Кондратьевой Е.Н. «Автотрофные микроорганизмы» (1996, 2000, Москва), VIII Symposium "Microbial Ecology" (1998, Canada); XI Congress of Nitrogen fixation (1997, Paris); IX Congress of Bacteriology And Applied Microbiology (2000, Sydney); "Third Int. Cong. Symbiosis (2000, Marburg); Int Sym. "Plant under Environmental stress" (2001, Moscow); XI Int. Cong. " Mol. Plant - Microbe Interaction" (2003, St.-Pb); научный семинар секции Биология Берлинского университета (Берлин, Германия, 1995, 1998, 2001, 2002).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 10 глав экспериментальной части, заключения, выводов. Материалы диссертации изложены на _____ страницах машинописного текста, содержат 76 рисунков и 34 таблицы, список литературы включает _____ наименований.

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили апогеотропные корни оранжерейных саговников, талломы папоротника р. *Azolla*, воздушные и субстратные корни эпифитных тропических орхидей. Для создания модельных ассоциаций использовали стерильные проростки и черенки растений

табака, риса, паслена, рапса и их культивируемые каллусные ткани. Список использованных в работе растений и культивируемых каллусных тканей представлен в табл. 1.

Выделение АКМ из природных сцианозов проводили методом многократных посевов разведений гомогенатов, полученных из предварительно простерилизованных растений папоротника *A. pinnata*, *Azolla sp.* и апогеотропных корней саговников на твердые (содержащие 2% агар) и жидкие питательные среды BG-11 и ее безазотного аналога BG-11₀ (Stanier et al., 1971).

Получение АКМ из апогеотропных корней саговников также проводили непосредственно из кусочков апогеотропных корней. Для этого предварительно простерилизованные кораллоидные корни разрезали на фрагменты длиной 2-3 мм и помещали в колбы и на чашки Петри со средами BG-11₀ и BG-11. Через 35-45 дней инкубации материала в люминисцирующей среде при 20-26° С и непрерывном освещении 1700 (лк) наблюдали визуально первичный рост АКМ. Полученные суспензии субкультивировали в колбах и на чашках Петри в тех же условиях. При культивировании АКМ на чашках Петри пересевы проводили каждые 3-5 дней, используя в качестве инокулята максимально удаленные от первичной колонии нити цианобактерий. Субкультивирование АКМ проводили 1 раз в месяц (объем инокулята 10% от объема свежей среды) на средах BG-11 и BG-11₀ с добавлением 5 г/л сахарозы.

Стерильные растения риса *Oryza sativa* сорта Кубань-3, табака *Nicotiana tabacum* сорта Самсун, паслена *Solanum nigrum* и рапса *Brassica napus var. Napus* получали из предварительно простерилизованных 30% перекисью водорода в течение 30 мин семян и выращивали на твердой среде, содержащей соли по прописи среды Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 0,7% агара. Семена риса сорта Кубань-3 получены из Российского научно-исследовательского института Риса (Краснодар). Стерильные растения альбиносного пластомного мутанта табака *N.tabacum PI* сорта Самсун получены из отдела «Биологии культивированных клеток» ИФР РАН им К.А.Тимирязева.

Черенкование растений табака двух штаммов (дикого вида и мутантного *P*), паслена и их выращивание проводили по общепринятой методике (Бутенко, 1999). В среду для черенков мутантного штамма *N.tabacum PI* добавляли 4% сахарозы.

Первичный каллус риса из семян и зародышей получали, как описано ранее (Кучеренко, 1986), а каллусы табака и паслена - по общепринятой методике из листовых эксплантов стерильных растений (Бутенко, 1999).

Инокуляцию растений риса, рапса, а также черенков паслена и табака двух штаммов проводили путем нанесения 1 мл суспензий АКМ в возрасте 1 месяца на поверхность агаризованной среды вблизи основания черенков или стеблей растений (плотность суспензии цианобионта в АКМ составляла $6,25 \times 10^5$ кл).

Получение смешанных с АКМ каллусов растений риса, табака и паслена проводили нанесением 1 мл суспензии АКМ в возрасте 1 мес той же плотности на поверхность каллуса в момент его пересадки (Корженевская, 1990).

В качестве абиогенного агента нодуляции (ААН) при индукции образования на корнях растений рапса псевдоклебеньков была выбрана 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4 -

Табл. 1. Объекты исследования и места их выращивания

| № | Вид растения | Форма | Место |
|-----|--|-----------------------------|------------------------------|
| 1. | | Оранжевое растение | ГБС РАН, Москва |
| 2. | <i>Cycas revoluta</i> Trumb. | "- | ТСХА, Москва |
| 3. | | "- | БИН РАН, СПб |
| 4. | | Открытый грунт | о. Кипр |
| 5. | | Оранжевое растение | ГБС РАН, Москва |
| 6. | <i>C. circinalis</i> L. | | БИН РАН, СПб |
| 7. | | "- | ГБС РАН, Москва |
| 8. | <i>C. micholitzii</i> Dyer | "- | БИН РАН, СПб |
| 9. | <i>C. rumphii</i> Miq. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 10. | | "- | ГБС РАН, Москва |
| 11. | <i>Ceratozamia mexicana</i> Brongn. | "- | БИН РАН, СПб |
| 12. | | "- | ГБС РАН, Москва |
| 13. | <i>Encephalartos ferox</i> Bertol | "- | БИН РАН, СПб |
| 14. | <i>E. villosus</i> Lehm. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 15. | | "- | ГБС РАН, Москва |
| 16. | <i>E. horridus</i> (Jacq.) Lehm. | "- | ТСХА, Москва |
| 17. | <i>E. hildenbrandii</i> R.Br. et Bouche | "- | ГБС РАН, Москва |
| 18. | <i>E. altensteinii</i> Lehm. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 19. | <i>Zamia media</i> Prenh. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 20. | <i>Macrozamia communis</i> L. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 21. | <i>Stangeria eriopus</i> (G.Kunze) Ball. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 22. | <i>Lepidozamia peroffskeyana</i> Regel | "- | ГБС РАН, Москва |
| 23. | <i>Dioon eduli</i> Lindl. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 24. | <i>Acampe papillosa</i> (Lidl.) Lindl. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 25. | <i>Dendrobium moschatum</i> (Buch.-Ham.) Sw. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 26. | <i>Phalaenopsis amabilis</i> (Lindl.) Bl. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 27. | <i>Dendrobium phalaenopsis</i> Fitzg. | "- | ГБС РАН, Москва |
| 28. | <i>Azolla pinnata</i> R.Brown. | "- | ИБХ РАН, Москва |
| 29. | <i>Azolla</i> sp. | "- | Ун-т им. Гумбольдтов, Берлин |
| 30. | <i>Brassica napus</i> L. | Проростки, растения | |
| 31. | <i>Nicotiana tabacum</i> L. (Сорт Самсун) | каллус, укорененные черенки | |
| 32. | <i>N. tabacum</i> P1 (Альбиносный мутант) | каллус, укорененные черенки | |
| 33. | <i>Oriza sativa</i> L. | каллус, проростки, растения | |
| 34. | <i>Solanum nigrum</i> L. | каллус, укорененные черенки | |
| 35. | <i>S. dulcamara</i> L. | каллус, укорененные черенки | |

Д). В качестве биогенных агентов нодуляции (БАН) для получения псевдо клубеньков на корнях растений риса, паслена, табака, рапса использовали: 1) АКМ папоротников *Azollasp.*, *A. pinnata* и апогеотропных корней саговников *C. revoluta*, *E. villosus*; 2) ассоциацию бациллобионтов *Micrococcus sp.n Rhodococcus sp.*, выделенную из ризосферы *C. revoluta*.

Исследование микробного комплекса апогеотропных корней саговников проводили в образцах: почвы, в которых растут саговники, ризосферы (аэроризосферы); ризопланы и гомогенатов стерильных корней. В качестве основного приема предварительной обработки образцов почвы, ризосферы, ризопланы и гомогената перед микробиологическим анализом использовали ультразвуковое диспергирование материала на низкочастотном диспергаторе УЗДН-1 (22 кГц; 0.44 А; 2 мин). Смыв с кораллоидных корней представлял образец ризосферы. Далее корни помещали в колбу с 20 мл стерильной воды и проводили десорбцию клеток с корней с помощью ультразвуковой обработки - таким образом получали образец ризопланы.

Для определения общей численности прокариот подсчитывали суммарное число колоний, выросших на данной среде, которое выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г почвы. Проводили дифференцированный учёт колоний актиномицетов и бактерий разных таксономических групп. Идентификацию выделенных штаммов до рода проводили на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков, используя Определитель бактерий Берджи (1997). Для определения чистых культур стрептомицетов до вида использовали ряд специальных сред (Зенова, 2000). Описание их культурально-морфологических признаков проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки. Идентификацию осуществляли согласно Определителю актиномицетов Гаузе с соавторами (1983). Частоту встречаемости бактерий характеризовали отношением числа образцов, в которых таксономическая группа обнаружена, к общему числу исследованных образцов.

Общую численность почвенных грибов учитывали на среде Чапека с 2 % сахарозы. Идентификацию чистых культур грибов проводили согласно Определителю Domsch (1993). Дифференциальное окрашивание проводили по методу Стоутона (Барыкина и др., 2000).

Цитологическое и ультраструктурное изучение симбионтов проводили с использованием методов световой, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (Лобакова, Баулина, 1986; Баулина и др., 1995).

Фенольные соединения экстрагировали из материала горячим 96% этанолом и смесью метанол : хлороформ в отношении 1:1 по методу Фолча (Folch et al., 1952). Разработанная процедура позволяет разделить экстракт на хлороформную фракцию - пригодную для определения липофильных веществ (пигментов) и водно-метанольную фракцию - для анализа растворимых фенольных соединений. Преимуществом использования метода Фолча является получение экстрактов кораллоидных корней, не содержащих фотосинтетические пигменты симбиотических цианобактерий (хлорофиллов и каротиноидов). Полосы поглощения этих пигментов перекрываются с таковыми фенольных соединений и затрудняют их спектрофотометрический анализ. Содержание суммы растворимых фенольных соединений определяли спектрофотометрическим методом (поглощение при 725 нм) с реактивом Фолина-Дениса, а

содержание флаванов (катехинов и проантоцианидинов) - по реакции с 1 % раствором ванилина в 70% H_2SO_4 , с последующим спектрофотометрированием при 500 нм. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (-)-эпикатехину (Загоскина, 1999).

Качественный состав фенольных соединений определяли хроматографически в тонком слое целлюлозы. В качестве растворителя использовали смесь н-бутанол+уксусная кислота+вода (40:12:28). Предварительную идентификацию фенольных соединений проводили на основании специфической флуоресценции в УФ-свете, по значениям R_f сравнительно с метчиками стандартами и по качественным реакциям со специфическими реагентами: смесью хлорного железа и красной кровяной соли - на все классы фенольных соединений; ванилиновым реактивом - на флаваны (катехины и проантоцианидины) и хлористым атланием - на флавонолы (Запрометов, 1971). Для выделения растворимых фенольных соединений из спиртовых экстрактов апогеотропных корней использовали адсорбент "Polyclar AT graef" (Serva).

Для цитохимических исследований различных зон (апикальной, базальной и зоны с активными цианобактериями) апогеотропных корней использовали срезы (толщина 10-30 мкм) свежес замороженных корней, полученных с помощью микротома-криостата (Россия). Для изучения локализации фенольных соединений использовали реакцию с хлорным железом - на фенольные соединения и с ванилиновым реактивом - на флаваны (катехины и проантоцианидины) (Загоскина и др., 1980).

Качественную оценку действия экстрактов фенольных соединений апогеотропных корней на рост ассоциативных микроорганизмов и цианобактерий проводили в тест системах на засеянных бактериями, грибами и цианобактериями газонах в чашках Петри.

Качественную оценку экзоферментативной пектолитической активности бактерий проводили «коп-плейтным» методом (Громова и др., 1976). Активности ферментов оценивали по редуцирующей способности продуктов, образующихся при инкубации фермента с пектовой кислотой для полигалактуроназы (ПГ) (К.Ф.3.2.1.15 поли (1,4-а Д-галактоуронид гликоногидролаза) или с пектином для пектинметилэстеразы (ПМЭ) (К.Ф. 3.1.1.11 - пектин-пектилгидролаза).

Активность нитрогеназы микросимбионтов в модельных ассоциациях определяли методом ацетиленредукции в модификации кафедры биологии почв МГУ (Методы..., 1991). Анализ содержания этилена в газовой фазе проводили на газовом хроматографе Chrom 4-1 (Чехословакия) с пламенноионизационным детектором (длина колонки 2,2 м, диаметр 3мм, наполнитель Spherosil + Na_3PO_4 , давление газа носителя (Ar) - 2,5 атм, водорода - 0,8 атм, воздуха - 0,4 атм).

Концентрацию бора в суспензиях клеток определяли с использованием модифицированного

Список сокращений, используемых на микрофотографиях: КСР - клеточная стенка растений; П - протопласт; Пд - перидерма; АЗ - апикальная зона; ЗЦ - зона цианобактерий; КП - кортикальная паренхима; Э - эндодерма; КВ - клетка-вместилище; ТК - транспортные клетки; АБ - ассоциативные бактерии; Б - клетки бактерий; Гф - гифы; ВК - вегетативная клетка; ЦПМ - цитоплазматическая мембрана; НМ - наружная мембрана; Т - тилакоид; Г - гормогоний; Гц - гетероциста; ОГ - оболочка гетероцисты; Пр - лора гетероцисты; Р - разрывы; ГС - гомогенный слой; ФС - фибриллярный слой; ПС - пластинчатый слой; СМ - слизистый матрикс.

куркуминового метода (Mair, Day, 1972).

Спектральные измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония). Спектры отражения и пропускания регистрировали с использованием интегрирующей сферы против сульфата бария. Результаты измерений выводили на IBM-совместимый компьютер и обрабатывали в электронных таблицах (Мерзляк, 1995).

Глава 1. Топография микросимбионтов в апогеотропных корнях саговников

Саговники—реликтовые голосеменные растения, являющиеся остатками господствующей в мезазое флоры, в настоящее время представлены 120-160 видами, объединенными в 10-11 родов (Norstog, Nicholls, 1997). В составе растительных сообществ они занимают ниши с ослабленной межвидовой конкуренцией - крутые карбонатные склоны, обрывы, скалы, песчаные дюны (Грушвицкий, Чавчавадзе, 1978; Norstog, Nicholls, 1997). Набоковых корнях растений часто формируются специфические структуры - апогеотропные корни (АК) (рис. 1), которые в процессе развития заселяются азотфиксирующими цианобактериями (Ahem, Staff, 1994). Клубеньковоподобные АК саговников, расположенные на/над поверхностью почвы и неинфицированные доминантным микросимбионтом, представляют собой прекораллоиды (рис. 1А). Зрелые инфицированные доминантным микросимбионтом АК, имеющие вид дихотомически ветвящихся кустиков, называются кораллоидными корнями (рис. 1Б) и часто располагаются не только на поверхности почвы, но и в верхних ее слоях.

На радиальных и тангентальных срезах кораллоидные корни всех изученных видов саговников имеют сходное строение (рис. 2). Снаружи они покрыты перидермой, состоящей из нескольких слоев сильно уплощенных мертвых клеток. Под ней располагаются: первичная кора, эндодерма и центральный цилиндр. В слое клеток кортикальной паренхимы локализуются симбиотические цианобактерии. На нативных радиальных срезах кораллоидов место их локализации выявляется в виде темно-зеленого блестящего кольца, делящего кортикальную паренхиму на две части - внешнюю и внутреннюю (рис. 2А). По совокупности особенностей морфологического строения кораллоидные корни саговников можно условно разделить на три зоны. Апикальная - 1-3 мм от кончика корня (рис. 2Б). В ней визуальнo и микроскопически отсутствуют цианобактерии. Зона функционально активных цианобактерий, содержащая многочисленные укороченные нити цианобактерий, состоящие из вегетативных клеток и специализированных азотфиксирующих клеток гетероцист, а также кластеры - группы вегетативных клеток, окруженные общим чехлом. Базальная зона - 3-5 мм, прилегающая к основанию АК. При

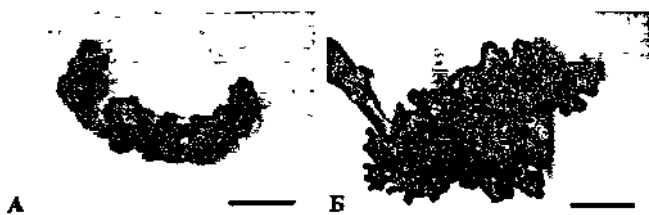


Рис 1. Внешний вид прекораллоидных корней *S. mexicana* (А); и кораллоидных корней *S. revoluta* (Б). Масш. отр. = 15 мм

А



Б



Рис. 2. Поперечный (А) и продольный (Б) срез апогеотропных корней *S. revoluta* (А) и *E. villosus* (Б). Масш. отр. А = 50 мкм

микроскопировании АК корней, в области локализации симбиотических цианобактерий, клеток бактерий и мицелия грибов не обнаружено.

На поверхности прекораллоидных корней, надземных и подземных кораллоидных корнях саговников, в межклетниках перидермы и внешнего слоя кортикальной паренхимы с помощью сканирующего электронного микроскопа обнаружены многочисленные клетки бактерий различных морфологических типов и гифы разного диаметра (рис. 3). На ультратонких срезах АК апикальной зоны, в складках клеточных стенок мертвых клеток перидермы выявлены скопления бактерий, часто расположенных в гомогенном электронно-плотном веществе (рис. 4).

Впервые при изучении дифференциально окрашенных по методу Стоутона срезах прекораллоидных корней *S. eriopus* и *D. edule* и при сканировании срезов кораллоидных корней *S. circinalis* и *E. villosus* в наружном слое клеток кортикальной паренхимы были обнаружены межклеточные несептированные гифы, везикулы и арбускулы, что характерно для грибов, образующих эндотрофную везикулярно-арбускулярную (ВА) микоризу (рис. 5).

В микроколониях цианобактерий кораллоидных корней пяти видов саговников - *E. villosus*, *S. mexicana*, *S. circinalis*, *S. revoluta*, *S. micholitzii*—наряду с интактными клетками было выявлено массовое образование форм с редуцированной клеточной стенкой - сферопластов и протопластов не только вегетативных клеток (рис. 6), но и гетероцист. Эти формы часто имели специфические ультраструктурные признаки, свидетельствующие о гиперпродукции экстрацел-



Рис. 3. Фрагмент поверхности кораллоидного корня *E*

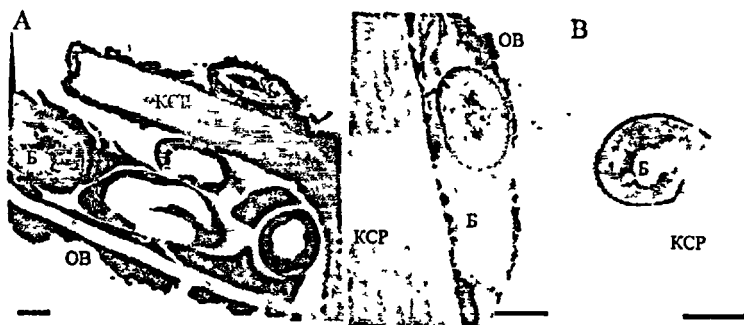


Рис. 4. Клетки ассоциативных бактерий в перидерме АК: а) и в) *C. circinalis*, б) *E.villosus*
Масш. отр. = 1 мкм

люлярных веществ, подобных полисахаридам слизистого межклеточного матрикса либо белкам (Баулина, Лобакова, 2003). Судя по ультраструктуре, функциональный статус этих групп форм с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток и гетероцист существенно различался.

Специализация группы клеток цианобактерий, доминирующей в кораллоидных корнях *S. mexicana* и *E. villosus* связана, очевидно, с гиперпродукцией слизи, формирующей межклеточный матрикс (рис. 6). Такие формы с редуцированной клеточной стенкой утрачивали рибосомы и нуклеоид по аналогии с ослизняющимися растительными клетками, например, в корневом чехлике (Данилова, Бармичева, 1980)

Формы с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток другой функциональной группы выделялись крупными размерами, обширными зонами нуклеоида и многочисленными рибосомами. Некоторые из них имели признаки внутрицитоплазматического синтеза электроноплотного межклеточного вещества, возможно, белковой природы. Среди саговниковых такие формы были обнаружены у представителей трех видов рода *Sycas*. В микроколониях цианобионтов кораллоидных корней *S. revoluta*, *S. micholuzii*, *S. circinalis*, кроме того, присутствовали гигантские протопласты с несколькими зонами нуклеоида.

В кораллоидных корнях *S. revoluta* и *S. circinalis* наряду с межклеточной была обнаружена внутриклеточная локализация симбиотических цианобактерий.



Рис. 5. Арбускула в клетке кортикальной паренхимы кораллоидного корня *E villosus*
Масш. отр. = 1 мкм



Рис. 6. Протопласт вегетативной клетки цианобионта в кораллоидном корне *S. mexicana*. Масш. отр = 0,2 мкм.

Из ризосферы и ризопланы надземных и подземных кораллоидных корней саговников выделено более 250 культур микроорганизмов. Численность всех групп микроорганизмов в прикорневой зоне исследуемых саговников убывает в ряду почва - ризосфера - ризоплана. Плотность бактериальных популяций падает от 28-0.3 млн. КОЕ/г в почве до 5-0.14 млн. КОЕ/г в ризоплане. Численность мицелиальных микроорганизмов еще более резко сокращается в ризоплане по сравнению с почвой: от 3 до 0 01 млн. КОЕ/г для актиномицетов, и от 90 до 4 тыс. КОЕ/г- для микромицетов(Табл.2).

Для большинства видов древесных и травянистых растений характерна противоположная (по сравнению с описанной) закономерность

в распределении микроорганизмов в прикорневой зоне растений (Кравченко, 2000; Добровольская, 2002; Vessey, 2003) Как правило, плотность микробных популяций, определяемая по методу посева, выше в ризосфере и ризоплане, чем в почве (ризосферный эффект).

Бактериальные сообщества в прикорневой зоне кораллоидных корней 7 видов саговников и в почве под ними в целом были представлены 12 таксонами (рис. 7). В их число входили как грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, так и грамтрицательные бактерии родов *Aquaspirillum*, *Azotobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* и порядка Мухососсаles. В бактериальных комплексах почв, используемых в теплицах для выращивания саговниковых рас-

Табл. 2. Численность бактерий (I) и актиномицетов (II) прикорневой зоны апогеотропных корней саговниковых растений (метод посева - тыс. КОЕ/г)

| ВИД | Почва | | Ризосфера | | Ризоплана | |
|-----------------------------|-------|------|-----------|------|-----------|-----|
| | I | II | I | II | I | II |
| <i>S. circinalis</i> | 28300 | 3200 | 19200 | 1400 | 5900 | 72 |
| <i>S. mexicana</i> | 11000 | 2600 | 7600 | 970 | 560 | 55 |
| <i>E. villosus</i> (30 лет) | — | — | 1000 | 200 | 1400 | 140 |
| <i>E. villosus</i> (50 лет) | 320 | 30 | 156 | 19 | 140 | 11 |

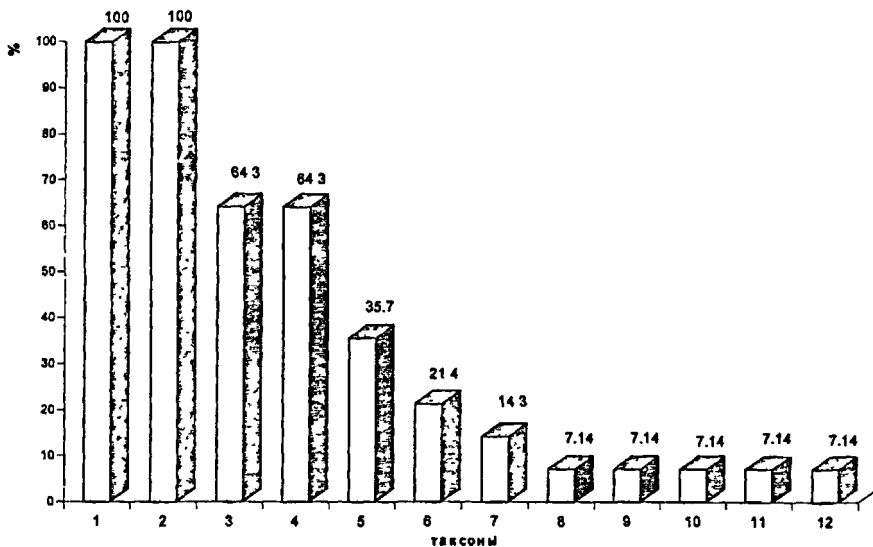


Рис 7. Частота встречаемости бактерий в проанализированных образцах почвы, ризосферы и ризопланы апогеотропных корней саговниковых растений (%): 1 - *Bacillus*, 2 - *Streptomyces*, 3 - *Arthrobacter*, 4 - Мухомокоцалес, 5 - *Rhodococcus*, 6 - *Cytophaga*, 7 - *Cellulomonas*, 8 - *Aquaspirillum*, 9 - *Azotobacter*, 10 - коринеподобные бактерии пигментированные, 11 - *Flavobacterium*, 12 - коринеподобные бактерии мелкие

тений, доминировали роды *Bacillus* (48-64%) и *Arthrobacter* (28%), в качестве субдоминантов (относительное обилие 20-30%) выделялись представители родов *Rhodococcus* (20%) и *Streptomyces* (18%). В структуре бактериального сообщества ризосферы и ризопланы надзем-

Табл. 3. Состав доминантов и субдоминантов ассоциативных бактерий кораллоидных корней саговников рода *Sycas* (относительное обилие в %)

| Вид растения / местообитание | Почва | | | Ризосфера | | | Ризоплана | | | | |
|--------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Роды бактерий | | | | | | | | | | |
| | <i>Bacillus</i> | <i>Arthrobacter</i> | <i>Streptomyces</i> | <i>Rhodococcus</i> | <i>Bacillus</i> | <i>Arthrobacter</i> | <i>Rhodococcus</i> | <i>Bacillus</i> | <i>Arthrobacter</i> | <i>Rhodococcus</i> | <i>Micrococcus</i> |
| <i>C. circinalis</i> (Москва) | 53 | | 18 | | 57 | 25 | | 77 | | 20 | |
| <i>C. circinalis</i> (СПб) | 48 | | | 20 | 22 | 69 | | 35 | | 59 | |
| <i>C. revoluta</i> (Москва) | 64 | 17 | | | 62 | 17 | | 43 | | | 21 |
| <i>C. revoluta</i> (СПб) | 50 | 28 | | | 67 | | 20 | 69 | | | |
| <i>C. micholitzii</i> (Москва) | — | — | — | — | | 86 | | | 32 | | 25 |

«-» - образец не исследовали

Табл. 4. Структура комплексов микромицетов надземных апогеотропных корней саговников *C. mexicana* и *E. villosus* (относительное обилие); жирным шрифтом отмечены доминанты

| Вид микромицета | <i>C. mexicana</i> | | <i>E. villosus</i> | |
|------------------------------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| | ризосфера | ризоплана | ризосфера | ризоплана |
| <i>Acremonium campylosporium</i> | 11,0 | | | 5,5 |
| <i>A. furcatum</i> | | 1,1 | | |
| <i>A. bacrocephalum</i> | | | 5,5 | |
| <i>Acremonium</i> sp. | | | 0,8 | 4,2 |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | 12,0 | 1,1 | | |
| <i>Cylindrocarpon olidum</i> | | 1,1 | 2,8 | 1,4 |
| <i>Gliocladium catenulatum</i> | 19,0 | 6,3 | 22,4 | 17,2 |
| <i>G. roseum</i> | 2,0 | 10,0 | | |
| <i>G. penicilloides</i> | | | 2,8 | |
| <i>Exophiala jeanselmei</i> | 32,0 | 13,0 | 49,4 | 58,4 |
| <i>Monocillium</i> sp. | | | | 1,4 |
| <i>Mycelia sterilia</i> Dem-3 | | 4,2 | | |
| <i>Mycelia sterilia</i> Mon-2 | 3,0 | 3,3 | | |
| <i>Mycelia sterilia</i> Dem-1 | 18,0 | 30,0 | | |
| <i>Nectria inventa</i> | | | | 1,4 |
| <i>Penicillium citreonigrum</i> | | | | 1,4 |
| <i>P. lilacinum</i> | | | | 1,4 |
| <i>P. corylophilum</i> | | | | 3,0 |
| <i>P. janzevskii</i> | 3,0 | | | |
| <i>P. puberulum</i> | | | 7,2 | 7,2 |
| <i>P. brevicompactum</i> | | 7,0 | | |
| <i>P. implicatum</i> | | 6,0 | | |
| <i>P. waksmanii</i> | | | 5,5 | |
| <i>Trichoderma artovinde</i> | | | 3,6 | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | | 11,0 | | |
| Всего | 8 | 13 | 9 | 11 |

ных АК, как и в почве, доминировали представители родов *Bacillus* и *Arthrobacter*. В качестве субдоминантов были выявлены бактерии родов *Rhodococcus* и *Micrococcus*. Бактерии остальных таксонов были представлены минорными компонентами (Табл. 3).

Таксономический состав бактериальных комплексов наземных АК оранжерейных экземпляров саговниковых растений практически не отличались друг от друга, независимо от вида растения и места их произрастания (оранжерейные комплексы Москвы, СПб, открытый грунт о. Кипр). Это свидетельствовало в пользу того, что на протяжении всего периода жизни растений на их корнях сохранялись определенные бактериальные формы. Таким образом, специфической особенностью бактериального комплекса наземных кораллоидных корней саговников является доминирование бацилл и актинобактерий, т.е. форм бактерий резистентных к высушиванию. При этом актинобактерии представлены разнообразными пигментными культурами коринсподобных бактерий, значительную долю которых составляют представители родов *Micrococcus* и *Rhodococcus*.

Интересно отметить, что и в синцианозе папоротников рода *Azolla* с цианобактерией *Anabaena azollae* в качестве ассоциативных бактерий описаны актинобактерии родов *Arthrobacter*, *Micrococcus* и *Rhodococcus*, несмотря на то, что этот синцианоз приурочен к обитанию в водной среде (Cararicco et al., 1999; Lechno-Yossef, Nierzwicki-Bauer, 2002).

Показателями структуры сообществ микроскопических грибов может служить богатство выделяемых видов, различные оценки их разнообразия, сходства, представленности (встречаемости, обилия) отдельных видов. Состав микроскопических грибов ризосферы и ризопланы АК саговниковых растений, также как и ассоциативных бактерий в основном сходен. Доминирующими во всех местообитаниях у растений, выращенных в условиях различных оранжерей и открытого грунта, являлись виды: *Exophialajeanselmei*, *Gliocladium spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*, *Acremonium spp.*, *Phialophora sp.* (табл. 4). Помимо этого в почваху *C. mexicana* неизменно доминировал вид *A. wentii*, у *C. revoluta* - *E.jeanselmei*. Из аэроризосферы кораллоидных корней *C. circinalis* в качестве доминантного вида был выделен *P. daleae*, а у *E. villosus* (30 и 50 лем) - *E.jeanselmei*. Во всех изученных биотопах преобладали грибы с выраженными целлюлозо- и пектинразрушающими свойствами.

Глава 3. Комплексы ассоциативных микроорганизмов воздушных корней эпифитных орхидей

Известно, что интенсивность микотрофности орхидных в значительной степени зависит от их экологической приуроченности и условий произрастания растений (Burgeff, 1959; Татаренко, 1995). Для сравнительного исследования комплекса ассоциативных микроорганизмов орхидных растений нами были выбраны орхидеи, произрастающие в условиях влажного тропического климата (влажность 90-100%) - *P. amabilis* и *D. phaelaenopsis* - и субтропического (влажность около 60%) - *A. papillosa* и *D. moschatum*.

Поверхность воздушных корней орхидей влажного тропического климата *P. amabilis* и *D. phaelaenopsis* была практически целиком покрыта темно-зеленой массой фототрофных микроорганизмов, формирующих на поверхности своеобразный чехол-оболочку толщиной до 3 мм. Для *A. papillosa* и *D. moschatum*, выращиваемых в условиях 60% влажности и имеющих помимо

воздушных корней и субстратные корни, формирование на поверхности воздушных корней такого мощного слоя ассоциативных фототрофных микроорганизмов не было отмечено. Даже визуальный осмотр воздушных корней данных видов орхидей показал, что комплекс их ассоциативных микросимбионтов существенно различался, и доминантным компонентом чехла-оболочки корней орхидей влажного тропического климата являлись фототрофные микроорганизмы, а орхидей субтропического климата - гетеротрофные микроорганизмы.

Изучение поверхности воздушных корней *P. amabilis* и *D. phalaenopsis* в световом микроскопе в составе плотного чехла-оболочки выявило различные нитчатые формы цианобактерий и многочисленные одноклеточные фототрофные микроорганизмы. Сканирование поверхности этих корней подтвердило данные об активном заселении аэроризосферы воздушных корней различными формами нитчатых цианобактерий. Помимо длинных нитей цианобактерий на поверхности также встречались укороченные цепочки, некоторые клетки которых имели поры и, по-видимому, являлись гетероцистами. Как правило, нити, укороченные цепочки цианобактерий располагались между гифами грибов. Таким образом, переплетающиеся между собой грибные гифы и нитчатые формы цианобактерий формировали своеобразный каркас поверхностного ассоциативного чехла-оболочки воздушных корней эпифитных орхидей.

Таксономический состав ассоциативных цианобактерий, формирующих чехол-оболочку на поверхности воздушных корней *P. amabilis* и *D. phalaenopsis*, был наиболее разнообразен. Доминирующими родами накопительных культур воздушных корней являлись азотфиксирующие гетероцистообразующие цианобактерии родов *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*, а также одноклеточные цианобактерии, нитчатые безгетероцистные формы родов *Spirulina*, *Oscillatoria* и LPP группы (цианобактерий родов *Lyngbia*, *Plectonema*, *Phormidium*) (табл. 5). Спектр ассоциативных цианобактерий чехла-оболочки воздушных корней *P. amabilis* и *D. phalaenopsis* был максимально разнообразен и включал различные физиолого-биохимические группы цианобактерий.

Табл. 5. Роды цианобактерии аэроризосферы воздушных корней эпифитных орхидей влажного тропического леса *P. amabilis* и *D. phalaenopsis*

| Вид орхидей | Субстратные корни | Воздушные корни |
|--------------------------|---|---|
| <i>A. papillosa</i> | <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , LPP | <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Calothrix</i> |
| <i>D. moschatum</i> | <i>Nostoc</i> , LPP, <i>Fischerella</i> | <i>Nostoc</i> |
| <i>D. phalaenopsis</i> * | | <i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i> , LPP |
| <i>P. amabilis</i> * | | <i>Nostoc</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Calothrix</i> , LPP, <i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> , одноклеточные цианобактерии |

* - орхидей «влажного тропического леса», на воздушных корнях которых формируется чехол-оболочка; полужирным шрифтом выделены азотфиксирующие гетероцистообразующие роды цианобактерий

Известно, что в природных экосистемах цианобактерии осуществляют многоканальные физиолого-биохимические реакции, переходя с одного пути метаболизма на другой, способны перемещаться из фотических слоев в ризосферу и переходить на гетеротрофный образ жизни (Панкратова, 2001; Fay, Parshec, 1989). В природных сообществах «автотрофные и diaзотрофные цианобактерии - бактерии - грибы» существует сбалансированное равновесие, которое способствует расширению экологической амплитуды всех компонентов ассоциаций (Панкратова, 1987), а цианобактерии в них часто играют роль организмов-эдификаторов (Заварзин, Калатилова, 2001).

Успешное прорастание семян орхидных растений *in vivo* возможно только в присутствии микоризообразующего гриба. Микоризация же корней генеративно зрелых фотосинтезирующих растений - явление не обязательное, однако, большинство орхидей сохраняют связь с микобионтом и продолжают переваривать в клетках кортикальной паренхимы грибные гифы (Withner, 1959; Залукаева, 1990). Для корней эпифитных орхидей отмечено присутствие гриба-микоризообразователя только в субстратных корнях или той части воздушных корней, которая имеет контакт с субстратом (Залукаева, 1990; Katiyar et al., 1986).

Изучение дифференцированно окрашенных по методу Стоутона срезов воздушных корней орхидей *P. amabilis* и *D. phalaenopsis*, формирующих на поверхности толстый чехол-оболочку из ассоциативных микроорганизмов, показало, что в клетках коровой паренхимы, под слоем веламена присутствуют клубки гиф микобионта или их полупереваренные остатки - пелотоны. Присутствие гриба - микоризообразователя в воздушных корнях эпифитных орхидей установлено впервые. Таким образом, чехол-оболочка на поверхности воздушных корней орхидей, образованный сложным по структуре сообществом ассоциативных микроорганизмов, является питательным субстратом для гриба - микоризообразователя и способствует колонизации им клеток коровой паренхимы эпифитных корней.

Лимитирующим фактором развития эпифитных орхидей может быть недостаточное количество связанного азота. Участие diaзотрофных цианобактерий в формировании чехла-оболочки позволило предположить, что одна из их функций в структуре описываемого сообщества ассоциативных микроорганизмов - фиксация молекулярного азота воздуха. В составе ассоциативных микроорганизмов чехла-оболочки воздушных корней *P. amabilis* помимо автотрофных и diaзотрофных цианобактерий (Цавкелова, Лобакова, 2002), были выявлены многочисленные таксоны бактерий (Цавкелова и др., 2001; 2003). В таких сообществах цианобактерии могут выступать, с одной стороны, в качестве diaзотрофных компонентов, с другой стороны, - могут обеспечивать азотфиксирующим гетеротрофным бактериям энергитические затраты для самостоятельной азотфиксации (Панкратова, 2001).

Для изучения потенциальной азотфиксирующей активности (АФА) микроорганизмов чехла-оболочки использовали фрагменты корней *P. amabilis*. Установлено, что потенциальная АФА фрагментов воздушных корней в среднем составляла 798.95 нмоль этилена/(ч г свежей биомассы). Эта цифра (в пересчете на нативную биомассу) наиболее корректна, поскольку остальные методы расчета (на хлорофилл, занимаемую площадь поверхности, общий белок или вес сухой биомассы) не учитывают АФА бактериальной составляющей сообщества, содержание

хлорофилла в самих корнях и неазотфиксирующих фототрофных микроорганизмов, многослойности чехла-оболочки и нахождение микроорганизмов в различных частях многослойного веламена.

Глава 4. О способности ассоциативных бактерий ризосферы и ризопланы АК саговников к синтезу пектолитических ферментов

За последнее десятилетие в микробиологической литературе накоплено множество фактов, свидетельствующих о том, что бактериальные сообщества полифункциональны и основной принцип их существования - кооперация. В ризосфере корней наиболее распространены, по-видимому, синтрофные взаимоотношения, основанные на подготовке одним организмом субстрата для другого и/или передаче факторов роста, либо удалении токсического продукта (Добровольская, 2002; Fay, Pashec, 1989). Имеются примеры синтрофного взаимодействия ассоциативных микросимбионтов корней бобовых, злаковых растений и пектин-разрушающих бактерий рода *Bacillus* и азотфиксирующих рода *Azospirillum*. Показано, что пектолитические ферменты ассоциативных микроорганизмов, разрушая пектин срединных пластинок растительных клеточных стенок, вызывают его мацерацию и локальный распад тканей, обеспечивают продвижение и компартментацию микросимбионтов внутри тканей растения (Khammas, Kaiser, 1992).

Качественная оценка экзоферментативной пектолитической активности культуральной жидкости ассоциативных бактерий АК саговников показала, что приблизительно 50% проверенных культур обладали ПГ активностью и 50% - ПМЭ. Только в культуральных жидкостях 7% культур не было обнаружено активности пектолитических ферментов. Большинство выделенных штаммов ассоциативных бактерий проявляли способность к синтезу обоих ферментов. Наличие ПГ было зарегистрировано у большинства представителей порядка Мухососcales, а ПМЭ - у коринеформных бактерий родов *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas* и спирилл рода *Aquaspirillum*.

Из коллекции ассоциативных бактерий АК было отобрано 26 штаммов бактерий ризосферны и ризопланы, представляющих 8 таксонов, у которых в культуральных жидкостях были определены количественные показатели активности ПГ и ПМЭ.

Среди культур бактерий, выделенных с поверхности (ризосферы), перидермы и наружных слоев кортикальной паренхимы (ризопланы) АК, доминантными являлись представители родов *Bacillus*, *Mucobacter*, *Arthrobacter*, коринеформные бактерии (Лобакова и др., 2003). Именно у данных культур бактерий были выявлены наибольшие значения активности обоих ферментов. Для бактерий рода *Arthrobacter* наличие в культуральной жидкости активности этих ферментов описано впервые.

Большинство из выделенных культур ассоциативных бактерий кораллоидов саговниковых растений способны к синтезу обоих тестируемых ферментов ПГ и ПЭМ. Пектиназы микроорганизмов имеют различные механизмы воздействия на пектин и разную субстратную специфичность. Это создает гибкую систему воздействия на клеточную стенку растений, при

которой в зависимости от свойств и состава клеточных стенок используются те или иные формы пекгиназа. Продукты деградации пектина могут использоваться ассоциативными бактериями ризосферы и ризопланы АК в качестве источников углеводного питания (Добровольская, 2002) и энергии для ассоциативной азотфиксации (Умаров, 1986).

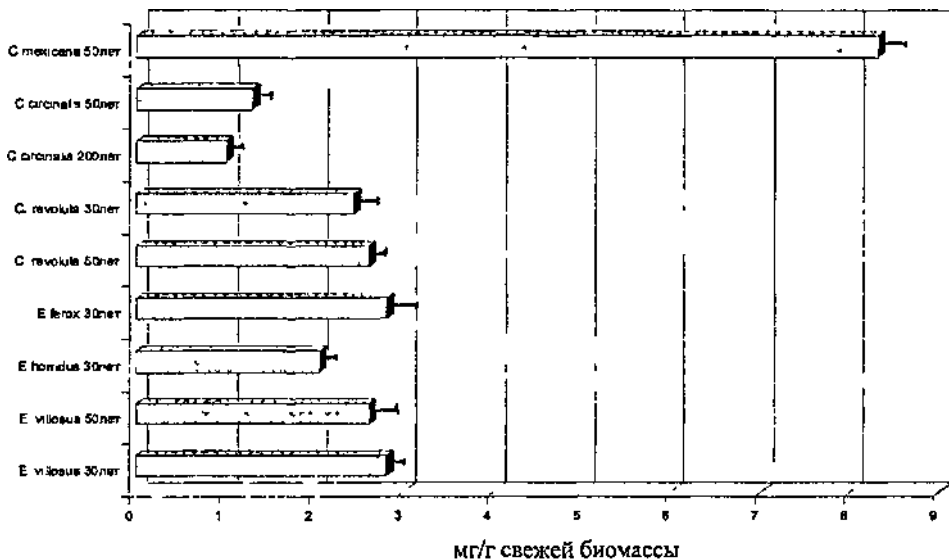
Учитывая, что плотность популяций ассоциативных бактерий достигает нескольких миллионов КОЕ на грамм АК (табл. 2), и что в сообществах микромицетов ризосферы и ризопланы АК преобладают грибы с выраженными целлюлозо- и пектинразрушающими свойствами, можно утверждать, что в кораллоидных корнях саговников существует потенциальный пул бактерий и грибов, способных к деструкции клеточных стенок перидермы и паренхимной ткани корня и, следовательно, способствующих проникновению доминантного микросимбионта азотфиксирующих цианобактерий внутрь корня.

Глава 5. Комплексы растворимых фенольных соединений АК саговников

Фенольные соединения являются одними из наиболее распространенных представителей вторичного метаболизма растений, вносящих значительный вклад в формирование растительных симбиозов (Зарометов, 1993; 1996; Shirley, 1995; Overholt et al., 1996). Биохимические способности АК саговников к образованию фенольных соединений до настоящего времени не исследовались. В литературе имеется лишь одна публикация (Obukowicz et al, 1981), в которой гистохимическими методами (реакцией с хлорным железом) показано их присутствие в кораллоидных корнях в зоне локализации симбиотических цианобактерий.

Определение суммарного содержания растворимых фенольных соединений в кораллоид-

Рис. 8. Содержание фенольных соединений в кораллоидных корнях



рых корнях 7 видов саговников показало, что наибольшее накопление фенольных соединений характерно для АК *C. mexicana* и оно превышало таковое других видов в 3,5-8 раз. Представители родов *Cycas* и *Encephalartos* обладали более низкой и почти одинаковой способностью к образованию фенольных соединений (рис. 8).

Анализ содержания растворимых фенольных соединений в надземных и подземных кораллоидных корнях саговников *C. micholitzii* (2 разных 15-летних растений) и *E. villosus* (одного растения) показал, что подземные кораллоидные корни накапливают их в 1,3 -1,5 раза меньше, чем надземные (табл. 6). Однако для подземных кораллоидных корней характерно возрастание доли флаванов в комплексе растворимых фенольных соединений по сравнению с надземными.

Сравнительный анализ накопления фенольных соединений боковыми корнями и расположенными на них АК показал, что у *C. mexicana*, *C. rwnphii* и *L. peroffskyana* прекораллоидные корни содержали лишь 15-50% от суммарного количества фенольных соединений определяемых в боковых корнях, тогда как в прекораллоидных корнях *D. edule* и *S. eriopus* их накапливалось 2-3 раза больше, чем в боковых. Цитологические исследования прекораллоидных корней выше перечисленных видов саговников показали, что в межклетниках кортикальной паренхимы прекораллоидов *D. edule* и *S. eriopus* располагаются многочисленные внутритканевые не-септированные гифы грибов, структуры типа везикул и единичные нити цианобактерий. То есть фрагменты прекораллоидных корней этих растений в момент изучения находились в процессе инфицирования ассоциативными и доминантным микросимбионтами (табл. 7).

Известно, что именно в ответ на проникновения микроорганизмов в ткани растения последние могут отвечать активацией синтеза фенольных соединений (Запрометов, 1996; Дьяков и др., 2001). Выявленный эффект возрастания количества растворимых фенольных соединений в прекораллоидных корнях *D. edule* и *S. eriopus*, содержащих гифы грибов ВА микоризы и нити цианобактерий также, по-видимому, связан с проникновением ассоциативных и доминантного микросимбионтов в ткани прекораллоидных корней. Полученные результаты согласуются с литературными данными о быстром накоплении связанных с клеточной стенкой ванилиновой и феруло-

Табл. 6. Содержание различных форм фенольных соединений в надземных и подземных кораллоидных корнях саговников *C. micholitzii* и *E. villosus* (мг/г свежей биомассы)

ФС - сумма растворимых фенольных соединений; ФЛ - флаваны; ФК - фенолкарбоновые кислоты

| Вид растения | ФС | ФЛ | ФК | Доля Ф, % |
|-----------------------------------|-----------|-----------|------|-----------|
| <i>C. micholitzii</i> (подземные) | 0,95±0,15 | 0,79±0,03 | 0,16 | 16 |
| <i>C. micholitzii</i> (надземные) | 0,62±0,07 | 0,57±0,05 | 0,05 | 8 |
| <i>E. vilosus</i> (подземные) | 0,84±0,05 | 0,38±0,02 | 0,46 | 54 |
| <i>E. vilosus</i> (надземные) | 0,61±0,05 | 0,60±0,03 | 0,01 | 0,1 |

Табл. 7. Содержание растворимых фенольных соединений в боковых и прекораллоидных корнях саговников (мг / г свежей биомассы)

| Вид растения | ФС | ФЛ | Доля ФК, % |
|--|-------|-------|------------|
| Прекораллоидные корни | | | |
| <i>C. mexicana</i> | 2,97 | 2,48 | 16 |
| <i>C. rumphii</i> | 1,04 | 0,4 | 6 |
| <i>L. peroffskyana</i> | 1,79 | 1,62 | 9 |
| Прекораллоидные корни, инфицированные грибами ВА микоризы | | | |
| <i>D. edule</i> | 46,55 | 20,72 | 55,48 |
| <i>S. erioopus</i> | 1,12 | 0,25 | 77,7 |
| Боковые корни | | | |
| <i>C. mexicana</i> | 20,23 | 8,79 | 50 |
| <i>C. rumphii</i> | 1,6 | 1,5 | 6 |
| <i>L. peroffskyana</i> | 12,37 | 11,02 | 11 |
| <i>D. edule</i> | 15,56 | 5,02 | 67,73 |
| <i>S. erioopus</i> | 0,81 | 0,15 | 81 |

см. обозначения в табл. 6.

вой кислот; и не связанных с ней флаванов, флавонолов и проантоцианидинов в корнях лиственницы на ранних стадиях формирования эктомикоризы (Weiss et al., 1997). Таким образом, неинфицированные прекораллоидные корни саговников содержали наименьшее количество растворимых фенольных соединений из всех проанализированных типов корней. Процесс внутритканевого инфицирования тканей прекораллоидных корней грибами ВА микоризы и цианобактериями был сопряжен с 2-3 кратным увеличением накопления в тканях фенольных соединений. При этом в ряду боковых корней - неинфицированные прекораллоидные корни - инфицированные ассоциативными микроорганизмами прекораллоидные корни - зрелые кораллоидные корни в экстрактах растворимых фенольных соединений наблюдалось возрастание доли флаванов.

Исследование фенольного комплекса боковых корней и АК (прекораллоидных и кораллоидных) методом одномерной тонкослойной хроматографии показало наличие в нем от 7 до 11 соединений. Во всех случаях были обнаружены флаваны - (+)-катехин, (-)-эпикатехин и проантоцианидины, а также соединения фенилпропаноидной природы - кофейная, феруловая, п-оксибензойная и ванилиновая кислоты. Кроме того, в экстрактах прекораллоидных и кораллоидных корней представителей рода *Cycas* - *C. micholitzii* и *C. rumphii*, впервые у саговников обнаружены флавонолы.

Определение содержания растворимых фенольных соединений в АК саговников с использованием для этого экстракции материала смесью хлороформа и метанола (1:1),

предложенной Фолчем с соавт. (Folch et al., 1957) выявило присутствие двух основных групп веществ - флаванов, представленных, главным образом, (-)-эпикатехином ($\lambda_{\max} \approx 265 \text{ нм}$), и фенольных кислот ($\lambda_{\max} \approx 320-330 \text{ нм}$). В отдельных случаях были обнаружены флавонолы и проантоцианидины, что согласуется с данными тонкослойной хроматографии.

Особенности локализации фенольных соединений в АК саговников

Важным аспектом в изучении рати фенольных соединений в жизнедеятельности растений является выяснение особенностей их локализации в тканях растений. Как свидетельствуют полученные нами данные, в ЛК саговников основными местами локализации фенольных соединений в кораллоидных корнях служили клеточные стенки клеток кортикальной паренхимы, межклетники и специализированные клетки-вместилища, которые по форме и размерам не отличались от окружающих их клеток паренхимного типа (рис. 9, 10). На срезах кораллоидов клетки-вместилища обычно были расположены в кортикальной паренхиме и центральном цилиндре, а их численность зависела от функциональной зоны АК и видовой принадлежности растения. В кораллоидных корнях представителей рода *Cycas* одиночные клетки-вместилища были распределены хаотично между клетками паренхимы (рис. 9). В апикальной и центральной зонах корней их число было невелико и практически одинаково. В базальной же части клетки-вместилища с фенольными соединениями были расположены в паренхиме и перицикле упорядоченно в виде колец параллельно эндодерме.

В кораллоидных корнях *E. villosus*, *E. horridus*, *E. ferrox* и *C. mexicana* группы клеткок-вместилищ с фенольными соединениями выявлялись во внешнем и внутреннем слоях кортикальной паренхимы. Наибольшее их число было отмечено в клетках паренхимы, прилегающих к месту локализации симбиотических цианобактерий. Кроме того, наблюдалось формирование пограничных слоев из клеток-вместилищ, ограничивающих в кортикальной паренхиме вдоль внешней и внутренней сторон зону симбиотических цианобактерий (рис. 11). Цитохимическую реакцию на флаваны (с 1% ванилиновой кислотой) давали также специализированные транспортные клетки растений, пронизывающие слизистое кольцо цианобактерий.

Наиболее выраженное накопление фенольных соединений характерно для базальной зоны кораллоидных корней. В этом случае реакцию на фенольные соединения и флаваны наблюдали не только в клетках-вместилищах, но также и в клеточных стенках клеток паренхимы и в межклетниках (рис. 10).

В кораллоидных корнях всех видов саговниковых растений присутствовали клетки, содержащие друзы кристаллов призматической формы. Они выявлялись в тканях АК в виде одиночных структур или небольших компактных групп. У кораллоидов *E. villosus* такие клетки часто дополнительно ограничивали с двух сторон зону локализации цианобактерий, образуя сплошной моно- или бислой (рис. 12). При проведении реакции с ванилином кристаллы в клетках давали розовое окрашивание. Это позволяло отнести данные вещества к классу флаванов.

Сопоставление данных о топографии распределения в кораллоидных корнях микросимбионтов (бактерий, грибов и цианобактерий) и клеткок-вместилищ с фенольными соединениями по-



Рис. 9. Клетка-вместилище (реакция на флаваны с ванилиновым реактивом) в кортикальной паренхиме кораллоидного корня *C. revoluta* Масш отр =2,5мкм

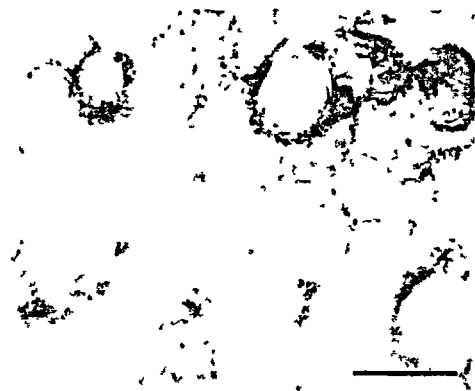


Рис. 10 Локализация фенольных соединений в клеточных стенках кораллоидных корней *C. mexicana*. Масш отр =5мкм

Рис. 11. Клетки – вместилища, ограничивающие зону локализации симбиотических цианобактерий Масш отрезок =5



казало, что в растительных клетках, граничащих с зоной симбиотических цианобактерий, наблюдается повышенный синтез и накопление растворимых фенольных соединений. Максимальное количество клеток-вместилищ было обнаружено в базальной зоне кораллоидных корней, где отсутствовали не только ассоциативные бактерии, но и жюнеспособные цианобактерии. В этой части АК фенольные соединения были выявлены не только практически во всех клетках кортикальной паренхимы и перицикла, а также в клеточных стенках и межклетниках. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтез и накопление фенольных соединений в АК саговников уча-

ствуют в процессе зонального распределения ассоциативных и симбиотических микроорганизмов. Проведенные нами исследования и сравнение их с литературными данными позволили предположить наличие универсального механизма регуляции со стороны растений, распространения и локализации доминантного и ассоциативных микросимбионтов во внутриклеточном пространстве симбиотических структур путем синтеза и специфического накопления в инфицированных тканях фенольных соединений группы флаванов.



Рис. 12. Клетки с кристаллами, ограничивающие зону цианобактерий в кораллоидном корне *villosus*

Глава 6. Влияние растворимых фенольных соединений экстрактов АК саговников на рост микросимбионтов

Описанная картина топографии микросимбионтов в АК, их жизнеспособность и метаболическая активность, по-видимому, определяются различной чувствительностью симбиотических цианобактерий, ассоциативных бактерий и грибов к синтезируемым растительными клетками и накапливающимися в их тканях фенольным соединениям.

Для выяснения этого аспекта было изучено действие фенольных соединений экстрактов АК на рост представителей следующих таксонов бактерий: родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium* - *Cytophaga*, *Clavibacter*, *Micrococcus*, *Aquaspirillum* и порядка Мухососсалес. Установили, что более выраженный ингибирующий эффект на рост тест-бактерий оказывали фенольные соединения кораллоидных корней, чем прекораллоидных. Наибольшее бактерицидное действие на рост тест-культур бактерий оказывал экстракт кораллоидных корней *E. villosus*, в котором доминировали флавановые соединения (проантоцианидины и (-)-эпикатехин). Наиболее чувствительными к действию флаванов оказались представители грамотрицательных бактерий группы *Flavobacterium*-*Cytophaga*, а наиболее устойчивыми - грамположительные бактерии родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. Экстракты фенольных соединений прекораллоидных корней стимулировали рост некоторых доминантных штаммов бактерий, особенно рода *Bacillus* (табл. 8).

Проверено действие фенольных соединений экстрактов АК выделенных из 7 видов саговников, на рост 20 доминантных и субдоминантных видов грибов, изолированных из прикорневой зоны 8 видов саговников. Обнаружен плеотропный характер действия экстрактов на рост микромицетов, проявлявшийся в ингибировании, стимуляции, изменении характера роста мицелия или отсутствии влияния. Фунгистатическое действие фенольных соединений экстрактов проявлялось в отсутствии роста грибов или образовании зон роста стерильного мицелия вокруг дисков. В некоторых случаях в зоне действия фенольных соединений из *C. mexicana* и *L. peroffskyana* наблюдали формирование зон интенсивного спороношения грибов. При тестировании стерильных форм микромицетов АК в присутствии фенольных соединений экстрактов АК наблюдали

Табл. 8. Стимуляция (+) или ингибирование (-) роста бактерий доминант ризосферы и ризопланы апогеотропных корней саговника *C. micholitzii* фенольными соединениями**, выделенными из экстрактов кораллоидных корней *C. micholitzii* и *E. villosus* и прекораллоидных корней *C. mexicana* и *L. peroffskyana*

| Бактерии | Ф С прекораллоидных корней | | Ф С кораллоидных корней | |
|--------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | <i>L. peroffskyana</i> | <i>C. mexicana</i> | <i>C. micholitzii</i> | <i>E. villosus</i> |
| Ризосфера | | | | |
| <i>Bacillus</i> sp. | | +2 | | -4,5 |
| <i>Bacillus</i> sp. | +4 | +3 | | -4,5 |
| <i>Arthrobacter</i> sp. | | | -2 | |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | | | | -3 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | -6 | | | -3 |
| Ризоплана | | | | |
| <i>Arthrobacter</i> sp. | +2 | +3 | -3 | -6 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | -5 | | | -3 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | -2 | -3 | | |
| <i>Mycobacterium</i> sp. | | -7 | | -8 |
| <i>Cellomonas</i> sp.* | | -12 | +7 | -10 |

* штамм изолирован из кораллоидных корней *C. micholitzii*

• • смесь растворимых фенольных соединений, выделенных из этанольных экстрактов АК саговников

различных видов спор (конидий, хламидоспор). Полученные данные дают основание полагать, что комплексы фенольных соединений экстрактов АК саговников оказывают существенное влияние на цикл развития ряда ассоциативных грибов - то есть выступают в роли стимуляторов или ингибиторов их роста (табл. 9).

Экстракты фенольных соединений АК не оказывали воздействия на рост ассоциативных грибов-доминантов кораллоидных корней: *E. jeanselmei*, *G. roseum*, *G. catenulatum*, *P. islandicum*, *E. solanl* Получены данные, свидетельствующие о том, что эти грибы имеют развитые ферментативные системы, принимающие участие в метаболизме и катаболизме фенольных соединений экстрактов АК.

Известно, что в природе процесс инфицирования вновь образуемых прекораллоидных корней происходит постоянно из популяции почвенных цианобактерий, а отдельные веточки одной грозди кораллоидных корней могут содержать разные виды цианобактерий (Costa, Lindblad, 2002). То есть внутри АК саговников отсутствует единая внутритканевая популяция симбиотических цианобактерий, обеспечивающая инфицирование вновь образуемых прекораллоидных корней. Для выяснения особенностей действия фенольных соединений АК саговников на симбиотические и свободноживущие цианобактерии были выбраны экстракты прекораллоидных корней *S. eriopus*

и *L. peroffskyana*, которые существенно различались соотношением фракций фенольных кислот и флаванов. В экстрактах АК *S. eiopus* на долю фенольных кислот приходилось 81%, а у *L. peroffskyana* - 11%.

Фенольные соединения экстракта *S. eriopus* оказывали стимулирующее влияние на рост как свободноживущей, так и культивируемые изоляты симбиотических цианобактерий. В культурах симбиотических цианобактерий *Nostoc* sp. f. *C. circinalis* u *Nostoc* sp. f. *E. altensteinii* была обнаружена массовая дифференциация гормогониев (рис. 13) и их направленное движение от первичной колонии цианобактерий к дискам с фенольными соединениями экстрактов АК, и появ-

Табл. 9. Стимуляция (+) или ингибирование (-) роста микромицетов субдоминант и доминант ризосферы и ризопланы АК *C. micholitzii* растворимыми фенольными соединениями, выделенными из кораллоидных корней *C. micholitzii* и *E. villosus* и прекораллоидных корней *C. mexicana* u *L. peroffskyana*

| Тест-микромицет | Зона подавления (-) или стимуляции (+) роста микромицетов растворимыми ФС (диаметр в мм) | | | |
|------------------------------------|--|-----------------|-----------------------|--------------------|
| | <i>L. peroffskyana</i> | <i>D. edule</i> | <i>C. micholitzii</i> | <i>C. mexicana</i> |
| <i>Acremonium camptosporum</i> | | -1 | | -1,5 |
| <i>Acremonium</i> sp. | | | | |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | +4 | +4 | +2 | +2 |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | +5 | +3 | | |
| <i>Gliocladium roseum</i> | | | | |
| <i>G. caten</i> | | | | |
| <i>Exophiala jeanselmei</i> | | | | |
| <i>Mortierella</i> sp. 1 | -2 | -4 | -2 | -2 |
| <i>Mortierella</i> sp. 2 | -3 | -3 | | |
| <i>Penicillium</i> sp. | | +3 | +5 | |
| <i>P. funiculosum</i> | -6 | -2 | -3 | |
| <i>P. purpurogenum</i> | -5 | -1 | | -2 |
| <i>P. islandicum</i> | | | | |
| <i>P. brevicum-compostum</i> | +2 | -1 | | +1 |
| <i>Phialophora cyclaminis</i> | | | | |
| <i>Phoma cava</i> | | | | |
| <i>Fusarium</i> sp. 1 | | | | |
| <i>Fusarium</i> sp. 2 | | | | |
| <i>Trichoderma artoviride</i> | +2 | | | |

(-) - отсутствие роста грибов или формирование зон роста стерильного мицелия вокруг дисков с экстрактами



Рис. 13. Массовое формирование гормогониев в культуре *Nostoc* sp. f. *C. ciranalis* при действии экстракта фенольных соединений *Seriopus*
Масш. отр. = 10 мкм

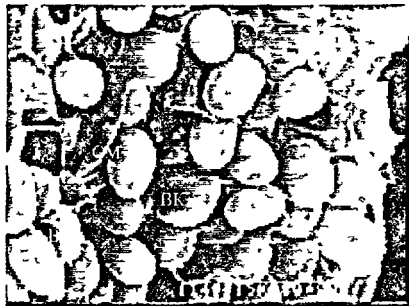


Рис. 14. Внешний вид культуры *Nostoc* sp. f. *C. circinalis* при действии экстракта фенольных соединений *L. peroffskyana*. Масш. отр.=5 мкм

ление вокруг них зон повышенной плотности цианобактерий шириной до 5 мм. Описываемый эффект положительного влияния фенольных соединений экстракта прекораллоидных корней *Seriopus* был более выражен у симбиотических цианобактерий.

Действие фенольных соединений экстракта АК из *L. peroffskyana* оказалось противоположным. В зоне диффузии экстракта в агар наблюдали подавление роста и изгнание цианобактерий (отрицательный таксис гормогониев) из зон, прилегающих к диску. В случае, если цианобактерии оказывались в непосредственном контакте с диском, происходило погружение их в толщу агара, сопровождавшееся формированием микроколоний, в основном состоящих из отдельных клеток цианобактерий, погруженных в слизистый матрикс, или кластеров (рис. 14). В кластерах клетки делились неравномерно в нескольких плоскостях, что свидетельствовало о нарушении процессов деления клеток. В культуре *изюйма* *Nostoc* sp. f. *C. circinalis* при воздействии комплекса фенольных соединений экстрактов АК *L. peroffskyana* образовывались формы с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток, которые по ультраструктурным особенностям были сходны с протопластами и сферопластами, обнаруженными нами в составе микроколоний цианобактерий в кораллоидных корнях саговников. В данных условиях не было обнаружено изменений в структуре специализированных оболочек гетероцист, однако, у большинства из них в клеточных стенках были выявлены нарушения целостности пептидогликанового слоя.

В присутствии растворимых фенольных соединений экстрактов *Seriopus* и *L. peroffskyana* как у свободноживущей, так и симбиотической цианобактерий наблюдалась гиперпродукция слизиподобного вещества. Можно полагать, что продукция слизи цианобионтами саговников является, в частности, механизм защиты популяции от бактерицидного действия некоторых фенольных соединений, разнообразный спектр которых был обнаружен в кортикальной паренхиме и транспортных клетках, пронизывающих зону локализации цианобактерий, кораллоидных корней.

При культивировании свободноживущей *A. variabilis* и изолятов симбиотических *Nostoc* sp. f. *C. circinalis* и *Nostoc* sp. f. *E. altensteinii* цианобактерий на жидких средах в присутствии (-) -эпикатехина (Serya) наблюдали массовое формирование спор- акинет

- Полученные данные свидетельствуют о том, что состав ассоциативных сообществ бактерий, микромицетов и цианобактерий прекораллоидных и кораллоидных корней саговников определяется специфическим для каждого вида растений комплексом растворимых фенольных соединений.

Глава 7. Является ли бор фактором, регулирующим стабильность растительных синцианозов?

Известно, что накопление фенолов в тканях растений является одним из первых признаков дефицита бора (Школьник и др., 1974-1984; Сакмак, Roemheld, 1997). В последние годы появились отдельные публикации, так или иначе объясняющие роль бора в формировании симбиозов растений с diazотрофными бактериями - бобово-ризобияльного (Bolanos et al., 1994; 1996; 2002; Bonilla et al, 1997; Redondo-Nieto et al., 2001) и актиноризного (Torrey, Callaham, 1982; Bonilla et al., 2002). Известно, что гетероцистобразующие цианобактерий, являющиеся доминантным микросимбионтом растительных синцианозов, обнаруживают потребность в боре, функция которого в diaзотрофных условиях состоит в стабилизации клеточных оболочек гетероцист (Bonilla et al., 1986-1996; Лобакова и др., 2000).

Так как в АК саговников цианобактерии, с одной стороны, находятся в зоне растительных клеток, накапливающих специфические фенольные соединения, существенно влияющие на процессы их клеточной дифференцировки, и, с другой стороны, могут удовлетворять свои потребности в боре, необходимого для обеспечения стабилизации структуры оболочек гетероцист, получая его только через растение, то исследовали участие бора в процессе формирования и регуляции стабильности синцианозов в целом и гетероцист у цианобионта в составе синцианозов.

Присутствие бора в среде культивирования свободноживущей цианобактерий *A. variabilis* и культивируемого изолята цианобионта *C. circinalis* при действии фенольных соединений экстрактов АК саговников *S. eriopus* и *L. peroffskyana* существенно: 1) изменяло морфологическую картину роста культур; 2) стимулировало продукцию клетками цианобактерий слизеподобного вещества. В присутствии бора у культивируемого изолята цианобионта *C. circinalis* при действии фенольных соединений экстракта АК *L. peroffskyana* на ультратонких срезах не были обнаружены формы с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток - протопласты и сферопласты. Культура, в основном, состояла из длинных трихомов, окруженных мощными многослойными чехлами.

В модельном эксперименте со свободноживущей цианобактерией *A. variabilis* ATCC 29413 было установлено, что отсутствие бора в среде культивирования не влияло на процесс образования новых гетероцист в популяции клеток *A. variabilis*, а воздействовало только на структурную организацию их оболочек и, следовательно, метаболическую активность. Это указывало на то, что бор не вовлечен в процесс дифференциации гетероцист. В отсутствии бора в diaзотрофных

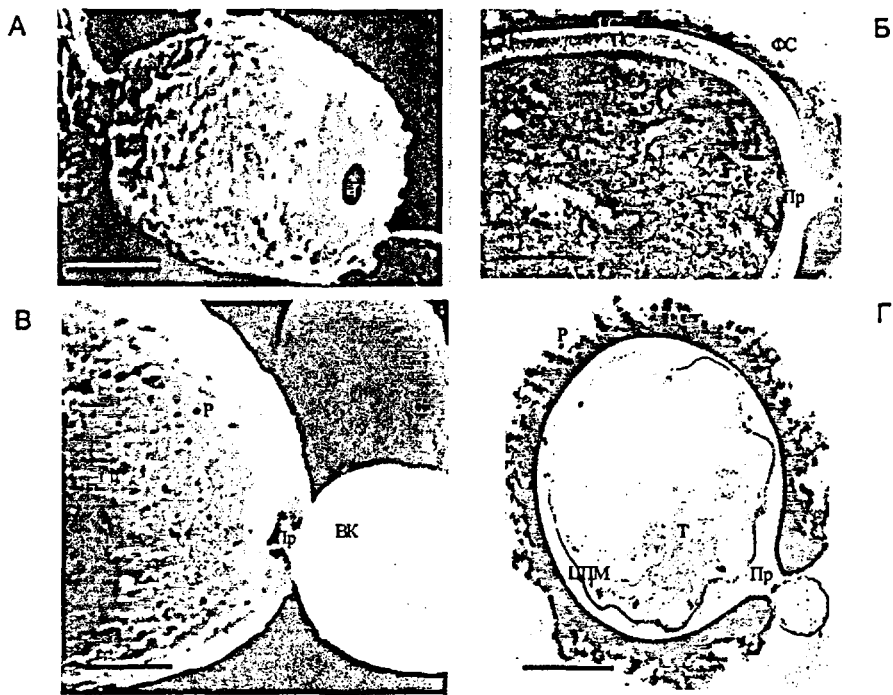


Рис 15. Гетероцисты культуры *A. variabilis*, выращенной на безазотной среде BG-11 в присутствии бора (А, Б) и на бордефицитной среде (В, Г). А, Г—сканирующая; Б, Д—трансмиссионная электронная микроскопия. Масш. отр. = (А,В) -1 мкм; (Б, Г) - 0,5 мкм

условиях роста цианобактерии *A. variabilis* гетероцисты изменяли форму с эллипсоидной на шаровидную и значительно, более чем в 2,5 раза, увеличивались в размерах (рис. 15). Их поверхность приобретала вид "апельсиновой корки" (рис. 15В). В структуре оболочек гетероцист наблюдали значительные деструктивные изменения всех слоев. Наиболее значимые изменения оболочек гетероцист происходили в фибриллярном и гомогенном полисахаридных слоях. Фибриллярный слой утрачивался полностью, а в гомогенном - наблюдали изменение плотности упаковки фибрилл, что приводило к его разрыхлению и увеличению толщины приблизительно в 3 раза и появлению регулярных, расположенных на расстоянии 0,5 мкм, разрывов, достигающих 2/3 его ширины, (рис. 15В, 15Г). Нарушение структуры оболочек гетероцист сопровождалось деструкцией клеточной стенки и цитоплазмы основной их массы (рис. 15Г). Это приводило к появлению

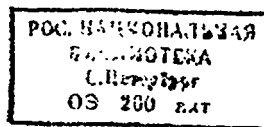
в нитях культуры *A. variabilis* диплетов и триплетов последовательных гетероцист, то есть в модельной системе у цианобактерий в условиях дефицита или отсутствия бора в diaзотрофных условиях проявлялись изменения физиолого-морфологических, сходные с таковыми для цианобактерий в составе симбиоза с растениями (Lindblad et al., 1985; Lindblad, Bergman, 1990; Rai et al., 1996:2000). Полученные данные и сопоставление их с литературными позволяет предположить, что в базальной части АК саговников симбиотические цианобактерии испытывают воздействие, по крайней мере, двух факторов - фенольных соединений флаванового ряда и дефицита бора. Об этом свидетельствует: 1) изменение морфологической структуры популяции цианобионтов - преобладание укороченных нитей, кластеров и/или одиночных клеток; 2) образование форм с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток - сферопластов и протопластов; 3) возрастание в популяции цианобактерии доли гетероцист, появление мультиплетных гетероцист и деградация их основной массы; 4) образование межклеточного слизистого матрикса.

Глава 8. Новые подходы в создании ассоциаций растений с diaзотрофными бактериями

Значительное позитивное воздействие ассоциативных симбионтов в составе растительных симбиозов связывают с интенсификацией процессов инфицирования растения доминантным микросимбионтом (Кравченко, 2000; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Vessey, 2003), в том числе и при формировании азотфиксирующих симбиозов. На наш взгляд, чрезвычайно перспективно использовать эту способность ассоциативных микросимбионтов при создании новых искусственных азотфиксирующих ассоциаций растений.

Наиболее эффективным способом обеспечения растений азотом является симбиотическая азотфиксация, при которой азот, фиксированный микроорганизмами без потерь, включается в состав растений. Это обусловлено специфической для каждого вида симбиоза компартиментацией микросимбионтов внутри тканей растения-хозяина в специализированных метаморфизированных структурах - клубеньках. В литературе обсуждается несколько подходов, направленных на расширение симбиотической азотфиксации на несимбиотрофные виды растений. Одно из них - паранодуляция - искусственное индуцирование образования псевдоклубеньков на корнях небольших растений под действием различных химических веществ (фитогормонов и/или литических ферментов) абиогенных агентов нодуляции (ААН) с одновременной инокуляцией этих структур азотфиксирующими микроорганизмами (Reddy et al., 1997; James et al., 1998). Действие ААН на растения возможно только в узких концентрационных пределах, что затрудняет применение их в полевых условиях. Формирование на корнях растений псевдоклубеньков при действии ААН приводит к нарушению морфологической организации корня как в зоне эпидермиса и кортикальной паренхимы, так и центрального цилиндра. Это способствует проникновению diaзотрофных бактерий в межклетники не только кортикальной паренхимы корней, но и проводящих тканей, что может приводить к закупорке сосудов ксилемы и гибели растений в целом.

Нами предложено в качестве нодулирующих агентов использовать ассоциации микроорганизмов (биологические агенты нодуляции - БАН), обладающих следующими характеристика-



ми: 1) синтезировать гормоноподобные вещества и/или ферменты разрушающие клеточную стенку растений (целлюлазу, пектиназы); 2) способность специфически адсорбироваться на поверхности корней экспериментальных растений. В связи с этим в опытах могут быть использованы как природные ассоциации микроорганизмов, отвечающие этим требованиям, так и модельные лабораторные системы.

Изучены особенности инфицирования растений табака (двух штаммов сорта Самсун), паслена (двух видов), риса и их культивируемых тканей АКМ, выделенными из природных синцианозов (папоротников *Azollapinnata*, *Azolla sp.* и саговников *E. fexos*, *C. revoluta*). Установлено, что при инокуляции интактных растений и черенков АКМ цианобактерии и ассоциативные бактерии способны заселять вегетативные органы растений: корень, стебель, лист. На корнях инокулированных растений в местах локализации компонентов АКМ наблюдали процессы неорганизованного (калусного) роста клеток кортикальной паренхимы и образование псевдо клубеньков (рис. 16). Установлено, что в межклеточных пространствах псевдо клубеньков в течение всего периода жизни лабораторных растений избирательно накапливались клетки активно метаболизирующих ассоциативных бактерий (рис. 17).

Способность АКМ, состоящих из цианобактерий и ассоциативных бактерий, к активному инфицированию различных органов растений и образованию на корнях псевдо клубеньков связана с деятельностью ассоциативных бактерий. Свободноживущая цианобактерия *A. variabilis* ATCC 29413, не способная к инфицированию растений пестролистного мутанта табака (Пивоварова и др., 1986), паслена черного, табака сорта Самсун и его альбиносного мутанта *PI*, в модельной системе с ассоциативными бактериями из папоротника *Azolla sp. u A.pinnata* заселяла различные органы и ткани растений. При этом на корнях инокулированных растений наблюдали массовое формирование псевдо клубеньков (рис. 18).

Поскольку псевдо клубеньки представляют собой участки калусного роста тканей корня, были изучены особенности взаимодействия компонентов АКМ с калусными культурами риса,



Рис. 16. Внешний вид псевдо клубенька на корне *S nigrum* (масш. отр. = 100 мкм)

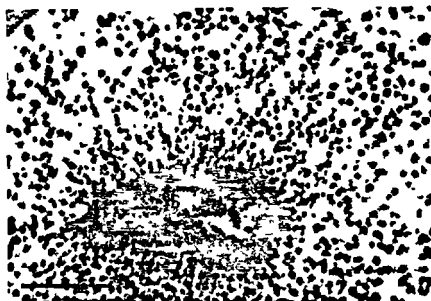


Рис. 17. Ассоциативная бактерия в межклетнике псевдо клубенька растения табака *PI* (масш. отр. = 0,5 мкм)



Рис. 18. Псевдо клубеньки на корнях растений риса

паслена и табака в связи с возможностью разделения АКМ папоротников на составляющие компоненты - ассоциативные бактерии и симбиотические цианобактерии.

Установлен различный характер заселения цианобактериями АКМ каллусов табака двух штаммов, паслена и риса, что, возможно, обусловлено особенностями морфологического строения растительных тканей, размерами их клеток и межклеточных пространств. Плотная, твердая каллусная культура риса практически лишена межклетников - зон внутритканевой компартментации цианобактерий, в которых в смешанных модельных культурах происходят максимальные ко-адаптационные перестройки партнеров (Korzhenevskaya et al., 1993; Gusev et al., 2002). С другой стороны, нами обнаружен и различный характер взаимодействия АКМ с каллусными культурами табака сорта Самсун двух штаммов: дикого типа и альбиносного мутанта *P1*. По внешнему

виду и морфологическому строению эти каллусные культуры сходны. Однако характер взаимодействия АКМ с ними противоположен. Известно, что не только сорта и линии в пределах одного вида растений, но и штаммы культур растительных тканей и клеток, полученных из одного растения, могут существенно отличаться друг от друга (Бутенко, 1999). Таким образом, процесс инфицирования АКМ культур тканей растений зависит от морфологических и метаболических особенностей каллусных культур, то есть является не только видо-, но и штаммоспецифическим.

Доминантный рост ассоциативных бактерий наблюдали на поверхности всех смешанных каллусов и формируемых на корнях ююкулированных растений псевдо клубеньков только при старении. Сходный характер заселения АКМ растений риса и укорененных черенков паслена (двух видов) и табака (двух штаммов) существенно отличался от многовариантного типа взаимодействия АКМ с каллусными культурами, полученными из этих же растений. При взаимодействии АКМ из папоротника *Azolla sp.* и *A. pinnata* с каллусными культурами была обнаружена специфичность влияния растительной ткани на рост АКМ в целом и его компоненты в отдельности. АКМ в отсутствие растительной ткани характеризовались сбалансированным ростом. При смешанном культивировании с каллусами наблюдали разделение АКМ и селекцию его компонентов. Так, в зависимости от вида или штамма растительного каллуса, в смешанной культуре был обнаружен преимущественный рост одного из компонента АКМ или их периоди-

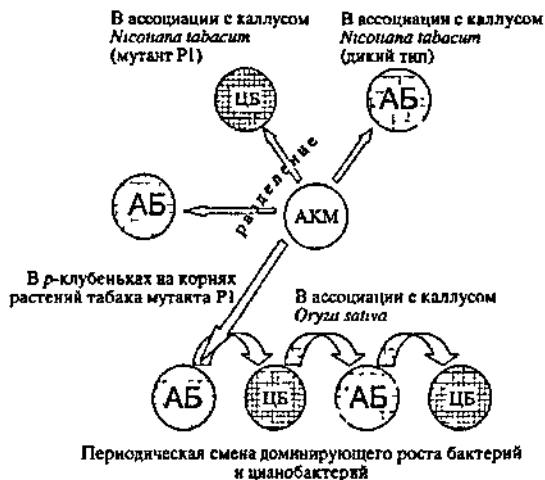


Схема. Различный характер роста компонентов АКМ с каллусными культурами растений

ческое развитие (схема). Различный характер роста цианобактерий и ассоциативных бактерий ЛКМ в смешанных культурах с растительными каллусными тканями (сбалансированный, периодический или доминирующий) может быть использован при разделении стабильных, многокомпонентных природных симбиотических комплексов и селекции их компонентов.

С другой стороны, возможность получения длительно пассируемых смешанных каллусов (табака и паслена с АКМ) может рассматриваться как перспективная экспериментальная модель для поддержания симбиотических свойств микросимбионтов при лабораторном культивировании.

Выявленная возможность разделения АКМ и селекция его компонентов растительными тканями может быть в дальнейшем использована при создании искусственных ассоциаций свободноживущих цианобактерий с ассоциативными микроорганизмами, выделенными из природных симбиозов.

Создание искусственного симбиоза между растениями рапса и diaзотрофными бактериями

Показана возможность создания искусственного симбиоза между растениями рапса и ассоциациями diaзотрофных микроорганизмов в модельных опытах - в жидкой среде и в стерильной почве, а также в вегетационном опыте. Отработаны условия получения псевдоклю-

Табл. 10. Динамика азотфиксирующей активности ассоциации diaзотрофных бактерий на корнях рапса в условиях вегетационного опыта

| Вариант опыта | АФА, нмоль $C_2H_4/(г_{корней} \cdot ч)$ | | | |
|---|--|-----------|-----------|------------|
| | сутки роста растений | | | |
| | 19 | 25 | 28 | 33 |
| контроль | 2,12±0,06 | 1,53±0,06 | 1,25±0,41 | 2,44±0,07 |
| ААН (2,4-Д) | 2,51±0,06 | 3,29±0,08 | 3,36±0,06 | 3,34±0,08 |
| БАН (А М из <i>C. revoluta</i>) | 1,62±0,02 | 2,24±0,05 | 3,15±0,03 | 2,87±0,06 |
| Дiazотрофная ассоциация <i>Azotobacter</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp. | 5,23±0,72 | 5,18±0,14 | 5,16±0,08 | 5,36±0,1 |
| БАН + [<i>Azotobacter</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.] | 8,97±0,9 | 8,95±1,2 | 10,34±0,6 | 10,24±1,46 |
| ААН + [<i>Azotobacter</i> sp. + <i>Bacillus</i> sp.] | 8,34±0,06 | 9,81±1,03 | 9,67±0,6 | 11,51±1,0 |

беньков на корнях растений при действии как ААН - 2,4-Д, так и БАН - ассоциации микроорганизмов АК саговников *C. revoluta* и *E.ferox*. Так как ассоциации микроорганизмов АКМ *C. revoluta* и *E.ferox*, используемые в качестве БАН, проявляли низкую АФА, экспериментальные растения дополнительно инокулировали высоко эффективной ассоциацией diaзотрофных бактерий (Ковальская и др., 1997; 2001; Лобакова и др., 2000).

Показано, что в модельных и вегетационном опытах образование псевдо клубеньков на корнях эксперимента растений происходило при действии ААН только в течение первых трех недель роста растений, а при действии БАН - в течение всего периода проведения экспериментов.

Изучены особенности локализации бактерий в боковых корнях растений рапса и псевдо клубеньках, сформированных при действии ААН и БАН. В последнем случае была обнаружена компартментация бактерий не только во внутритканевых пространствах псевдо клубеньков и боковых корней, но и внутри клеток.

В вегетационном опыте максимальный уровень АФА был отмечен у рапса в фазы бутонизации и цветения растений.

Установлено, что АФА бактерий при компартментации во внутритканевом пространстве псевдо клубеньков и боковых корней в модельных опытах была примерно в 5-6 раз, а в вегетационных опытах - в 2 раза выше (табл. 10), чем при поверхностной локализации используемой ассоциации diaзотрофных бактерий *Azotobacter* sp. + *Bacillus* sp. на корнях рапса. Для экспериментальных растений с псевдо клубеньками инокулированными diaзотрофными микроорганизмами установлено повышение продуктивности по биомассе в среднем на 40%.

Заключение

В современной литературе предложено рассматривать растения как центры формирования специализированных сообществ микроорганизмов (Звягинцев и др., 1993; Добровольская, 2002; Vessey, 2003). В процессе роста они непрерывно выделяют в окружающую среду различные

комбинации органических соединений (Bolton et al., 1993), которые создают специфический статус фило- и ризосферы каждого конкретного растения и создают селективные условия для взаимодействия с окружающими микроорганизмами, занимающими ту же экологическую нишу, определяют их таксономический состав и пространственно-функциональную организацию. Популяции почвенных микроорганизмов в ризосфере растений, вступая друг с другом в сложные взаимоотношения - конкурентные или кооперативные, и заселяя различные части органов растений, формируют специфический "микросимбиоз" каждого растения (Проворов, 2001). При этом в пределах одного растения можно проследить ступени последовательного усложнения морфологического и функционального соподчинения ассоциативных и доминантного микросимбионтов с макросимбиотом. В составе таких симбиозов микросимбионтов, как правило, наблюдается пространственное разделение ассоциативных и доминантного симбионтов в специализированных экологических нишах растения-хозяина (полостях, межклетниках, клетках), в которых отсутствуют конкурентные отношения между ними.

Проведенное нами комплексное изучение таксономического состава микросимбионтов уникальных синцианозов реликтовых саговниковых растений, особенностей их пространственного распределения в симбиотических структурах АК позволяет констатировать существование специфического для данной группы растений симбиоза микросимбионтов, обеспечивающего эволюционное и экологическое сохранение симбиоза в целом. Известно, что в симбиозах наблюдается значительное возрастание экологической пластичности составляющих организмов. При этом стабильность монотипных растительных сообществ достигается снижением внутривидовой борьбы за счет взаимодействия с почвенными микроорганизмами (Douglas, 1994).

Стабильное существование симбиоза невозможно без контроля макросимбиотом численности, интенсивности метаболизма и репродуктивной активности микросимбионтов. Полученные нами результаты указывают на то, что качественный и количественный состав растворимых фенольных соединений, накапливаемых в АК саговников, а также дефицит бора в растительных тканях в местах локализации микросимбионтов регулирует взаимоотношения растений с ассоциативными и доминантным микросимбионтами и, по-видимому, оказывает влияние на их метаболизм, процессы клеточной дифференциации и жизнеспособности в направлении, благоприятном для развития растения-хозяина.

Полученные нами результаты, в совокупности с имеющимися литературными данными позволяют утверждать, что значительное позитивное воздействие ассоциативных симбионтов на развитие растения-хозяина и симбиоз в целом происходит за счет: 1) улучшения минерального питания растений, в частности, обеспечения солями фосфора, калия (Белимов и др., 1999; Kim et al., 1998; Mashalha et al., 2000), связанным азотом в результате ассоциативной азотфиксации (Умаров, 1986; Vessey, 2003); 2) интенсификации процессов инфицирования хозяина доминантным симбиотом, в том числе за счет локальной продукции фитогормонов (цитокининов, ауксинов, гиббереллинов) в местах локализации ассоциативных микросимбионтов (Кравченко, 2000; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000; Vessey, 2003) и/или синтеза ферментов, локально разрушающих клеточные стенки растений, обеспечивающих продвижение доминантного микросимбионта в глубь

тканей растения - хозяина; 3) защиты растения и симбиоза в целом от патогенных микроорганизмов (Воронин, 1998; Lugtenberg et al., 1994; Bashan, Holguim, 1997; Lugtenberg, 2003).

Основные выводы

1. Впервые для синцианоза саговниковых растений выявлено наличие многокомпонентных ассоциативных комплексов микросимбионтов в ризосфере и ризоплане АК. Таксономический состав бактериальных и грибных комплексов АК саговников разных видов практически не отличались друг от друга, независимо от места их роста (оранжереи ГБС, Москва, БИН им. Комарова, СПб, о. Кипр). Это свидетельствует в пользу того, что на протяжении всего периода жизни растений на их корнях сохраняются определенные формы ассоциативных микроорганизмов. Обосновано представление о том, что в процессе эволюции адаптационная амплитуда реакций саговниковых реликтовых растений, определяющая их сохранение, связана с функционированием в специализированных органах растений, эффективной симбиотической системы, включающей доминантный микросимбионт - азотфиксирующие цианобактерии и широкий спектр ассоциативных микросимбионтов - бактерий и грибов.

2. Впервые в клетках кортикальной паренхимы прекораллоидных и кораллоиных корней саговников обнаружен несептированный мицелий, везикулы и арбускулы грибов ВА микоризы. Доказано, что только азотфиксирующие цианобактерии выступают в качестве доминантного внутритканевого симбионта, а бактерии и грибы, заселяющие поверхность и ризоплану АК, являются ассоциативными микросимбионтами.

3. В составе внутритканевых микроколоний цианобактерий АК саговников обнаружены формы с редуцированной клеточной стенкой вегетативных клеток и гетероцист, имеющие признаки гиперпродукции слизеподобного вещества. Это дает основание предполагать участие симбиотических цианобактерий в синтезе слизистого межклеточного матрикса специализированной зоны кораллоидных корней саговников.

4. Впервые изучено накопление и локализация растворимых фенольных соединений в АК саговников 7 родов. Этот фенольный комплекс представлен фенилпропаноидами, флаванами, флавонолами и проантоцианидинами. Количество фенольных соединений в АК не зависит от возраста изученных растений, а определяется наличием в тканях микросимбионтов. Максимальное содержание фенольных соединений характерно для базальной части кораллоидных корней, где отсутствуют жизнеспособные формы симбиотических цианобактерий.

5. Установлено наличие универсального механизма регуляции растением-хозяином распространения и локализации доминантного diaзотрофного микросимбионта во внутритканевом пространстве симбиотических структур растений путем синтеза и специфического накопления фенольных соединений группы флаванов.

6. Выделенные из ризосферы и ризопланы АК ассоциативные бактерии, симбиотические и свободноживущие цианобактерии отличались по устойчивости к синтезируемым АК фенольным соединениям. Фенольные соединения саговников влияют на появление в популяциях цианобак-

терий форм с редуцированной клеточной стенкой (протопластов и сферопластов) и процессы клеточной дифференциации: в зависимости от качественного состава фенольных соединений экстрактов АК может происходить либо стимуляция, либо ингибирование формирования гормонов и акинет

7. Показано, что фенольные вещества АК саговников выступают в роли стимуляторов или ингибиторов роста ассоциативных грибов. Доказано, что доминантные виды грибов ризосферы и ризопланы АК саговников обладают развитыми ферментативными системами, участвующими в метаболизме и катаболизме фенольных соединений.

8. Впервые для получения псевдоклебеньков на корнях несимбиотрофных видов растений использованы ассоциативные комплексы микросимбионтов, выделенные из природных синцианозов. Основным преимуществом этого способа является получение устойчивых ассоциаций микроорганизмов с корнями испытываемых растений. Это обеспечивает: 1) независимость процесса образования псевдоклебеньков на корнях растений от концентрации веществ-индукторов; 2) устойчивость азотфиксирующих ассоциаций по отношению к аборигенной микрофлоре; 3) формирование на корнях инокулированных АКМ растений псевдоклебеньков в течение всего периода онтогенеза растения.

9. На основании анализа собственных и литературных данных выдвинута гипотеза о регуляторном действии бора и фенольных соединений в структурно-морфологических и физиолого-биохимических взаимоотношениях партнеров при внутритканевой или внутриклеточной локализации цианобионтов в синцианозах голосеменных и покрытосеменных растений. Фенольные соединения и дефицит бора являются факторами, регулирующими морфогенез симбиотических органов и структуру популяции цианобионта.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 94-04-125836, 97-04-483636, 00-04-48708, 00-15-97911; 03-04-48456, Международным научным фондом грант № J6J100)

По теме диссертаций опубликовано 73 печатных работы. Основное содержание отражено в следующих публикациях:

1. Лобакова Е.С., Горелова О.А., Корженевская Т.Г. Азотфиксирующие цианобактерии как ингибиторы и стимуляторы роста растений // "Микроорганизмы - стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных": Тезисы Всесоюзной конференции. Ташкент. 1989. С. 122.
2. Корженевская Т.Г., Горелова О.А., Скрипников А.Ю., Лобакова Е.С., Баулипа О.И. Взаимодействие азотфиксирующих цианобактерий с растительными клетками и тканями в искусственных синцианозах // В сб. «Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями». Пушино. 1989. С. 189-193.
3. Баулина О.И., Лобакова Е.С., Пивоварова Л.В. и др. Морфофизиологическая характеристика искусственных синцианозов // В сб. «Молекулярные и генетические механизмы вза-

- имодействия микроорганизмов с растениями». Пушино. 1989. С. 193-198.
4. Корженевская Т.Г., Лобакова Е.С., Горелова О.А., Гусев М.В. Реконструирование симбиозов на примере лишайников и синцианозов //Актуальные проблемы экспериментальной лихенологии в СССР. Тр. БИН им. В.Л. Комарова. Наука :Л. 1991. С21-30.
 5. Korzhenevskaya T.G., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S. Butenko R.G., Gusev M.V. Artificial syncyanoses: the potential for modeling and analysis of natural symbioses // Symbiosis. 1993. V.15 P. 77 - 103.
 6. Баулина О.И., Лобакова Е.С., Корженевская Т.Г., Бутенко Р.Г., Гусев М.В. Ультраструктура клеток женьшена и цианобактерии *Chlorogloeopsisfritschii* в ассоциации при культивировании в темноте //Вест. МГУ. Сер. Биол. 1995. №2 С. 1-16.
 7. Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Корженевская Т.Г., Гусев М.В. Цианобактерино-бактериальный комплекс микросимбионтов из папоротника *Azolla* в искусственных ассоциациях с каллусом и растениями табака //Тез. докл. конф. памяти акад. РАН .Кондратьевой Е.Н «Автотрофные микроорганизмы». Москва. 1996. С. 44.
 8. Глаголева О.Б., Ковальская Н.Ю., Киреев И.И., Лобакова Е.С., Умарова М.М. Паранадуляция рапса при инокуляции азотфиксирующими ризосферными бактериями //Микробиология. 1997. Т. 66. С. 545-552.
 9. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Lobakova E.S., Umarov M.M. The potential of extending of symbiotic nitrogen fixation to naturally non-nodulated plants // Proc. 11th Inter. Cong. Nitrogen Fixation. Paris. 1997. P. 412- 414.
 10. Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Корженевская Т.Г. Цианобионты апогеотропных корней *Cycas revoluta* и *Encephalartos horridus* //Сб. Трудов междун. Конф. «Современные проблемы альгологии и фитопатологии". М. 1998. С. 342-343.
 11. Глаголева О.Б., Лобакова Е.С., Ковальская Н.Ю., Умаров М.М., Корженевская Т.Г. Морфологические особенности строения псевдо клубеньков рапса // ДАН РАН. 1998. Т. 362. № 2. С. 283-285.
 12. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Lobakova E.S., Umarov M.M. Endosymbiosis formation between rape roots and nitrogen-fixing bacteria // 8th Inter. Symp. On Microbial Ecology. Halifax. 1998. P. 162.
 13. Дольникова Г.А., Лобакова Е.С., Дубравина Г.А. Загоскина Н.В. Корженевская Т.Г. О локализации фенольных соединений в апогеотропных корнях саговниковых растений //Тезисы 4 съезда Физиологов раст. М. 1999. С. 213-214.
 14. Корженевская Т.Г., Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Гусев М.В. Особенности топографии микросимбионтов в апогеотропных корнях саговников *Cycas revoluta* и *Encephalartos horridus* //Микробиология. 1999. Т. 68. С. 528-533.
 15. Лобакова Е.С., Ковальская Н.Ю., Умаров М.М. Формирование эндофитного симбиоза между корнями рапса *Brassica napus* var. *Napus* и азотфиксирующими микроорганизмами //Тезисы 4 съезда Физиологов раст. М. 1999. Т. 2. С. 228.
 16. Kovalskaya N.U., Glagoleva O.B., Lobakova E.S., Umarov M.M. Formation of nodule-like

- structures on roots of oil-sees rape under influence of biotic and abiotic agents //Abst. 9th Inter. Con. Of Bacteriology and Applied Microbiology. Sydney. 1999. P. 254.
17. Лобанова Е.С., Дольникова Г.А., Трошина Ю.В., Корженевская Т.Г. Ассоциативный комплекс микросимбионтов апогеотропных корней саговника *Cycas revoluta* ПСб.тр. науч. конф. к 110-летию со дня рожд. проф. Е.Е.Успенского «Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов» / Москва: Диалог-МГУ. 2000. С. 55.
 18. Lobakova E.S., Baulina O.I., Troshina U.V., Zagoskina N.V., Korzhenevskaya T.G. Structure of coralloid roots and the synthesis of phenol compounds therein: a study with different cycad species // Progr. abstr. and papers of the Third International Congress on Symbiosis. Philipps Univer. of Marburg. Germany, 2000. P. 122.
 19. Лобанова Е.С., Дольникова Г.А., Варшавский А., Корженевская Т.Г. Морфологическая характеристика гетероцистообразующей цианобактерии *Anabaena variabilis* ATCC 29413 в условиях дефицита бора // Материалы межд. науч. конф. к 75-летию со дня рожд. акад. РАН Кондратьевой Е.Н. «Автотрофные микроорганизмы». Москва: МАКС Пресс. 2000. С. 117.
 20. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Lobakova E.S., Umarov M.M. Extending of symbiotic nitrogen fixation to nonlegumes: an efficient source of nitrogen for sustainable agriculture // 3th Inter. Sym. Of the working Group MO "Interaction of soil minerals with components and microorganisms. Itali. 2000. P. 23.
 21. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Лобанова Е.С., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Микробионта поверхности корней орхидных // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 567-573.
 22. Лобанова Е.С., Баулина О.И. Морфология и ультраструктура симбиотических цианобактерий в апогеотропных корнях саговниковых растений в период покоя // Тезисы Всероссийской конф. «Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках». СПб. 2001. С. 60-61.
 23. Лобанова Е.С., Дольникова Г.А., Корженевская Т.Г. Особенности цианобактериально-бактериальных комплексов микросимбионтов растительных синцианозов // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 111-116.
 24. Лобанова Е.С., Щелманова А.Г., Корженевская Т.Г., Гусев М.Б. Особенности инфицирования растений и их культивируемых тканей ассоциативными цианобактерино-бактериальными комплексами микросимбионтов // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 352-359.
 25. Лобанова Е.С., Ковальская Н.Ю., Умаров М.М. Новые подходы в создании ассоциаций растений с diaзотрофными микроорганизмами // Тезисы Всероссийской конференции «Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI веках». СПб. 2001. С. 60-61.
 26. Lobakova E.S., Dubravina G.A., Zagoskina N.V., Korzhenevskaya T.G. Soluble phenol compounds of cycads' apogeous roots // Abst. of the Inter. Symp. «Plant under Environmental stress». Moscow. 2001. P. 168-169.
 27. Ковальская Н.Ю., Лобанова Е.С., Умаров М.М. Формирование искусственного азотфиксирующего симбиоза у растений рапса (*Brassica napus* var. *Napus*) в нестерильной почве

- //Микробиология. 2001. Т. 70. С. 701-708.
28. Korzhnevskaya T.G., Dol'nikova G.A., Sinitsyn S.V., Lobakova E.S. Model of studying boron- and nitrogen-dependent stress and recovery in heterocystous cyanobacterium //Abst. of the Inter. Symp. «Plant under Environmental stress». Moscow. 2001. P. 137-138.
 29. Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С. Ассоциативные сине-зеленые водоросли (цианобактерии) эпифитных орхидей //Труды II Межд. Конф по анатомии и морфологии растений. СПб. 2002. С. 400-401.
 30. Gusev M.V., Baulina O.I., Gorelova O.A., Lobakova E.S., Korzhnevskaya T.G. Artificial Cyanobacterium-Plant Symbioses // In: Cyanobacteria symbiosis / A.N. Rai, B.Bergman, U. Rasmussen (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordmoot. 2002. P. 253 - 313.
 31. Лобакова Е.С., Оразова М.Х., Добровольская Т.Г. Структура микробных комплексов апогеотропных корней и прикорневой зоны саговниковых растений //Микробиология. 2003. Т. 72. С. 707-713.
 32. Цавкелова Е.А., Лобакова Е.С., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Особенности локализации ассоциативных цианобактерий на корнях эпифитных орхидей // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 99-104.
 33. Лобакова Е.С. Новые представления о природе симбиоза. В сб: Материалы Всерос. конф. «Физиология растений и экология на рубеже веков». Ярославль. 2003. С. 162.
 34. Цавкелова Е.Л., Лобакова Е.С., Чердынцева Т.А., Коломейцева Г.Л., Нетрусов А.И. Ассоциативные цианобактерии, выделенные с корней эпифитных орхидей //Микробиология. 2003. Т. 72. С. 105-110.
 35. Lobakova E.S., Korzhnevskaya T.G. Is boron a factor regulating the stability of syncyanoses? /Abs. 11 Int. Cong. Mol. Plant - Microbe Interac. St-P. Russia. 2003. P. 344.
 36. Лобакова Е.С., Оразова М.Х., Добровольская Т.Г. Структура циано-бактериальных сообществ, формирующихся при деградации апогеотропных корней саговниковых растений // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 714-717.
 37. Оразова М.Х., Семенова Т.А., Лобакова Е.С. Микобиота корней саговниковых растений // в сб: Материалы Всерос. конф. «Физиология растений и экология на рубеже веков». Ярославль. 2003. С. 168.
 38. Лобакова Е.С. Структурно-функциональные особенности синцианоза саговниковых растений // в сб: Материалы Всерос. конф. «Физиология растений и экология на рубеже веков». Ярославль. 2003. С. 163.
 39. Баулина О.И., Лобакова Е.С. Гетероцисты с редуцированной клеточной стенкой в популяциях цианобионтов саговников //Микробиология. Т. 72. С. 806-815.
 40. Баулина О.И., Лобакова Е.С. Необычные клеточные формы с гиперпродукцией экстрацеллюлярных веществ в популяциях цианобионтов саговников // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 792-805.
 41. Лобакова Е.С., Оразова М.Х., Добровольская Т.Г. Влияние фенольных соединений саговников на рост бактерий-спутников //Тез. Докл. «VI Симпозиум по фенольным соеди-

- нениям». Москва. 2004. С. 51.
42. Соловченко А.Е., Лобанова Е.С., Загоскина Н.В. Возможности спектрофотометрического определения фенольных соединений в апогеотропных корнях саговниковых растений // Тез. Докл. «VI Симпозиум по фенольным соединениям». Москва. 2004. С. 108.
 43. Лобакова Е.С., Загоскина Н.В. Об образовании фенольных соединений в боковых и апогеотропных корнях саговников // Тез. Докл. «VI Симпозиум по фенольным соединениям». Москва. 2004. С. 50.
 44. Горелова О. А., Лобакова Е.С., Корженевская Т.Г. Инфекционная активность изолированных из природных симбиозов цианобактерий в отношении несимбиотрофных растений // Вест. МГУ. Сер. Биол. 2004. № 4.
 45. Лобакова Е.С., Артамонова Е.Н. Влияние фенольных экстрактов апогеотропных корней саговников на цианобактерии // Тез. Докл. «VI Симпозиум по фенольным соединениям», 28-30 апреля. Москва. 2004. С. 49.
 46. Лобакова Е.С., Дольникова Г.А., Оразова М.Х. О способности бактерий ризосферы и ризопланы апогеотропных корней саговниковых растений к синтезу пектолитических ферментов // Вест. МГУ. Сер. Биол. 2004. № 2. С. 19-23.
 47. Лобакова Е.С., Дубравина Г.А., Загоскина Н.Б. Особенности образования и накопления фенольных соединений в апогеотропных корнях саговниковых растений // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 4. С. 541-549.

Автор выражает глубокую признательность своим учителям - профессору З.Э.Беккер, чл.-корр. РАН Р.Г. Бутенко, профессору М.В. Гусеву, профессору Т.Г. Корженевской и вед. науч. сотр. О.И. Баулиной.

Автор благодарит коллег, в соавторстве с которыми были выполнены отдельные части работы: О. А. Горелову, Т.Г. Добровольскую, М.Х. Оразову, Г.А. Дольникову, Н.Ю. Ковальскую, Е.А. Цавкелову, А.Е. Соловченко, Е.Н. Артамонову, А.Г. Щелманову, О.Б. Глаголеву, Т.А. Федоренко, R. Ehwald и Ch. Titel (Берлинский университет им. Гумбольдтов), а также весь коллектив кафедры физиологии микроорганизмов биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Выражаю глубокую признательность сотрудникам ГБС РАН им. Цицина (г. Москва) - Колобову Е.С., Золкину С.Ю., Костюченко Л.Л., Щелейковскому В. Л., Чикуровой Г.В., сотрудникам оранжерейного комплекса БИН им. Комарова (СПб) Н.Н. Арнауту и Е. М. Арнауту - за предоставленные образцы апогеотропных корней саговников и образцы эпифитных корней тропических орхидей.

Автор выражает признательность за консультации, помощь в работе и поддержку профессору М.М. Умарову, докт. биол. наук Н.В. Загоскиной, профессору А.М. Носову, доценту А.В. Киташову, с.н.с. Е.Н. Биланенко, с.н.с. О.В. Камзолкиной, доценту Г.А. Беляковой.

Лобанова

Издательство ООО "МАКС Пресс".
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.
Подписано к печати 14.09.2004 г.
Формат 60x90 1/16. Печлист 2,0. Тираж 100 экз. Заказ 980.
Тел. 939-3890, 939-3891, 928-1042. Тел./факс 939-3891.
119992, ГСП-2, Москва,
Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова.

16825

3

643