

УДК 581.1.035.23

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

М. Г. ШАМЦЯН, Е. Н. АВВАКУМОВА, академик М. Х. ЧАЙЛАХЯН

**О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СОВМЕСТНО КУЛЬТИВИРУЕМОЙ
СИСТЕМЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ
И КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ**

Факторы, обуславливающие образование клубеньков на корнях бобовых растений, влияющие на характер взаимоотношений клубеньковых бактерий и бобовых растений и в итоге определяющие эффективность их симбиоза, до настоящего времени выяснены недостаточно. Трудоемкость и длительность полевых и вегетационных опытов и ограниченные возможности для проведения экспериментов в строго контролируемых условиях затрудняют всестороннее изучение этой двухкомпонентной симбиотической системы.

Для изучения симбиотических взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий в течение последних десятилетий многими авторами применялся метод культуры изолированных органов, в частности корней. Результаты этих работ и возможности использования этого метода подробно освещены и обобщены в монографии Смирнова (¹).

Сравнительно недавно в литературе появились единичные сообщения о первых попытках применения метода тканевых культур при изучении симбиотических взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий (^{2, 3}). Успешной оказалась попытка совместного культивирования корневых клеток бобовых растений и клубеньковых бактерий (^{4, 5}). Цитологические и электронно-микроскопические исследования бактериальных и растительных клеток, а также определения нитрогеназной активности по восстановлению ацетилена в этилен привели к обнаружению интересного явления — полученная симбиотическая система обладала слабой азотфиксирующей активностью. Ни растительные, ни бактериальные клетки при отдельной инкубации этой способностью не обладали.

Интересной и перспективной представлялась нам возможность применения совместной культуры изолированных тканей и клеток корней бобовых и клубеньковых бактерий для изучения вопросов явления специфичности.

Для осуществления этой задачи прежде всего нами была получена культура изолированной корневой ткани люцерны *Medicago sativa* L. 5-миллиметровые отрезки корней стерильных растений люцерны (сорт 08 P11 Přelouč) с соблюдением условий асептики механически травмировались и пересаживались на агаризованную среду Мурасиге и Скуга (⁶), содержащую индукторы каллусообразования. После 10–20 суток инкубации на кусочках корней наблюдалось каллусообразование, а через 40–50 дней кусочки недифференцированно растущей ткани — каллусы пересаживались на свежую среду Мурасиге и Скуга. Работа по получению каллусов корней люцерны проводилась в 1970 году в группе изолированных органов Института физиологии растений им. Тимирязева АН СССР, руководителю которой проф. А. М. Смирнову и сотрудникам авторы приносят благодарность. Полученная культура в дальнейшем поддерживалась периодическими пассажами через каждые 1,5–2 мес. на той же среде в темноте при температуре 26°.

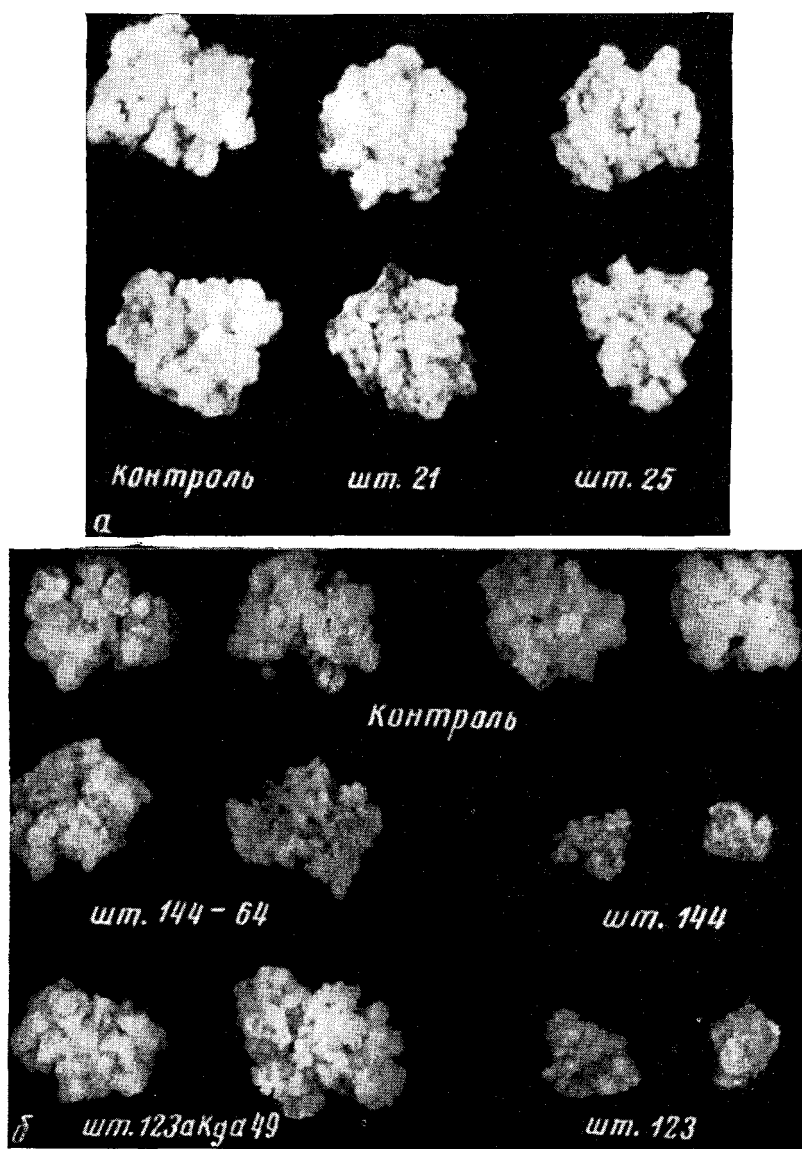


Рис. 1. Каллусы корневых клеток люцерны после 30 суток совместного культивирования с клубеньковыми бактериями различной видовой специфичности. а — со специфическими клубеньковыми бактериями люцерны, штаммы 21 и 25; б — с неспецифическими клубеньковыми бактериями гороха, штаммы 144, 123, с изменившими специфичность мутантными формами, штаммы 144-64 и 123аKa49. Контроль — неинфицированная ткань

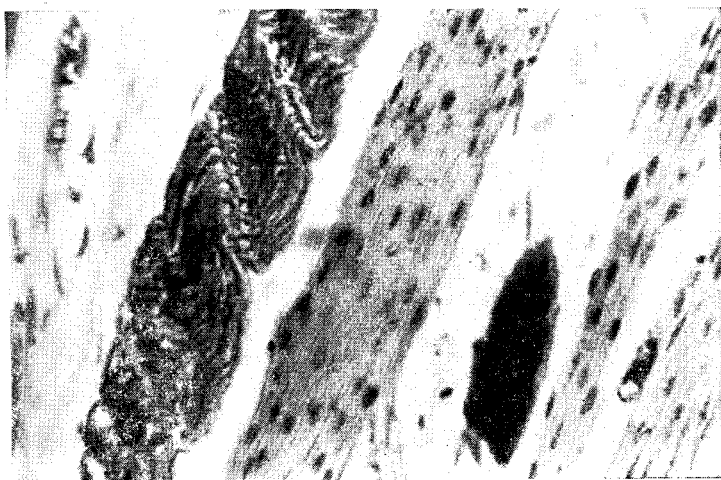


Рис. 1. Мышечные волокна с большим числом ядер в 2-месячном аутографте. Железный гематоксилин. 200×

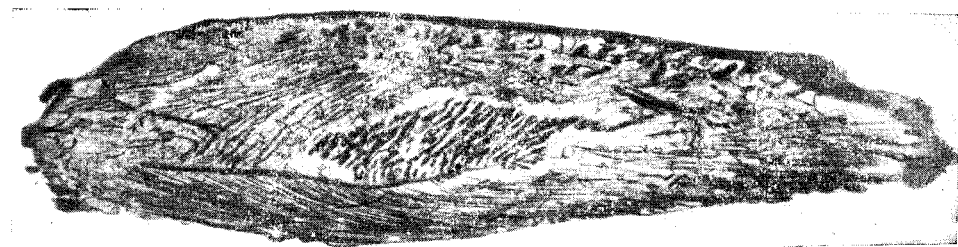


Рис. 2. Общий вид среза 2-месячного аутографта. Инъекция сосудов тушью. 6×

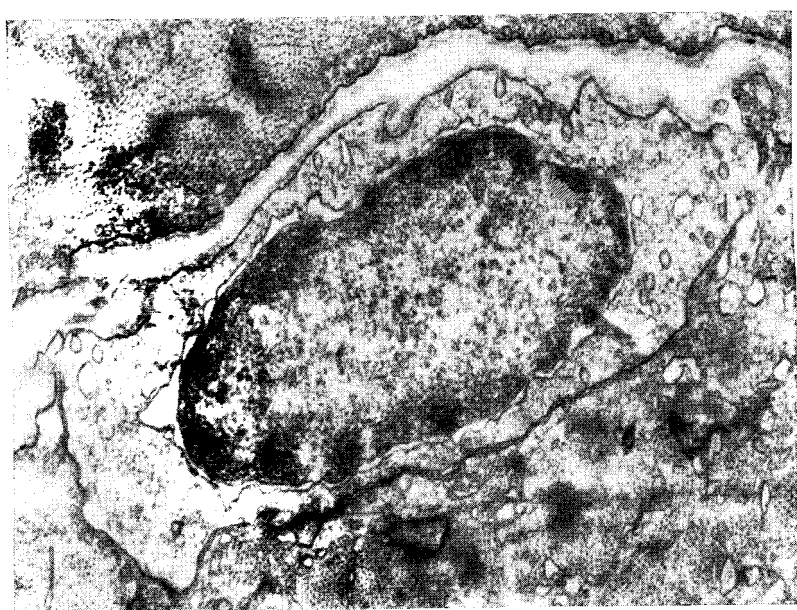


Рис. 4. Клетка-сателлит в 6,5-месячном аутографте, 12750×

С целью выяснения характера взаимоотношений изолированных корневых клеток люцерны и клубеньковых бактерий мы начали изучение реакции растительных клеток на инфицирование штаммами клубеньковых бактерий разной видовой специфичности. Было испытано влияние штаммов специфичных (клубеньковые бактерии люцерны, штаммы 24 и 25 *Rhizobium meliloti*), неспецифичных (клубеньковые бактерии гороха, штаммы 144 и 123 *Rhizobium leguminosarum*), а также штаммов, изменивших свою специфичность (мутант 144—64 и полиплоид 123 ак9а49, полученные соответственно от исходных штаммов клубеньковых бактерий гороха 144 и 123 с помощью мутагена и полиплоидогена). Эти последние штаммы, изменившие свою видовую специфичность и приобретшие способность образовывать клубеньки на корнях люцерны, были получены в лаборатории азотфиксирующих микроорганизмов Института микробиологии АН АрмССР Аввакумовой и др. (7).

После предварительного 7-дневного культивирования в чашках Коха на агаризованной среде Мурасиге и Скуга с добавлением 0,1% дрожжевого экстракта («Difco») кусочки растительной ткани инфицировались штаммами клубеньковых бактерий в концентрации примерно 10^7 клеток на каллус. На 1, 3, 10 и 30-е сутки совместного культивирования растительных и бактериальных клеток учитывались число живых и мертвых растительных клеток, а также соотношение их длинных и круглых форм в растительной ткани. К концу опыта после совместного культивирования растительных и бактериальных клеток в течение 1 мес. определяли прирост растительной биомассы по сухому весу (табл. 1).

Данные табл. 1 и рис. 1 показывают, что неспецифичные для люцерны штаммы *Rh. leguminosarum* 144, 123 угнетают рост корневых каллусов люцерны, а специфичные штаммы *Rh. meliloti* 24, 25 и штаммы 144—64 и 123 ак9а49, изменившие свою специфичность и обладающие способностью образовывать клубеньки на корнях люцерны, не оказывают сколько-либо заметного отрицательного влияния на рост корневых каллусов люцерны.

Четко выраженное влияние штаммов различной специфичности на жизнеспособность растительных клеток наблюдалось при учете живых и мертвых клеток. Живые и мертвые растительные клетки дифференцировались с помощью раствора метиленового синего 1:100 000. Подсчеты велись не меньше чем в 10 полях зрения, общая сумма подсчитанных клеток превышала 1000. Эти данные приведены в табл. 2.

Полученные результаты указывают на определенную градацию влияния штаммов различной специфичности на жизнеспособность корневых клеток люцерны. В то время как специфичные штаммы почти не оказывают отрицательного действия на жизнеспособность корневых клеток люцерны, неспецифичные пагубно воздействуют на ткань, штаммы же, изменившие свою специфичность, отличаются от исходных (неспецифичных) заметным ослаблением отрицательного влияния.

Микроскопирование растительных тканей показало некоторое увеличение количества длинных форм клеток в вариантах с инфицированием каллусов клубеньковыми бактериями гороха. Было подсчитано соотношение длинных и круглых форм растительных клеток в каждом варианте опыта в разные сроки совместного культивирования. Результаты подсчетов приведены в табл. 2. Оказалось, что клубеньковые бактерии в первый же день культивирования влияют на количественное соотношение мел-

Таблица 1
Влияние штаммов клубеньковых бактерий разной видовой специфичности на рост изолированных корневых тканей

Варианты	Сухой вес	
	мг	%
Контроль	279	100
Штамм 24	230	82,4
Штамм 25	245	88,8
Штамм 144	58	20,8
Штамм 144—64	233	83,5
Штамм 123	127	45,5
Штамм 123ак9а49	284	101,8

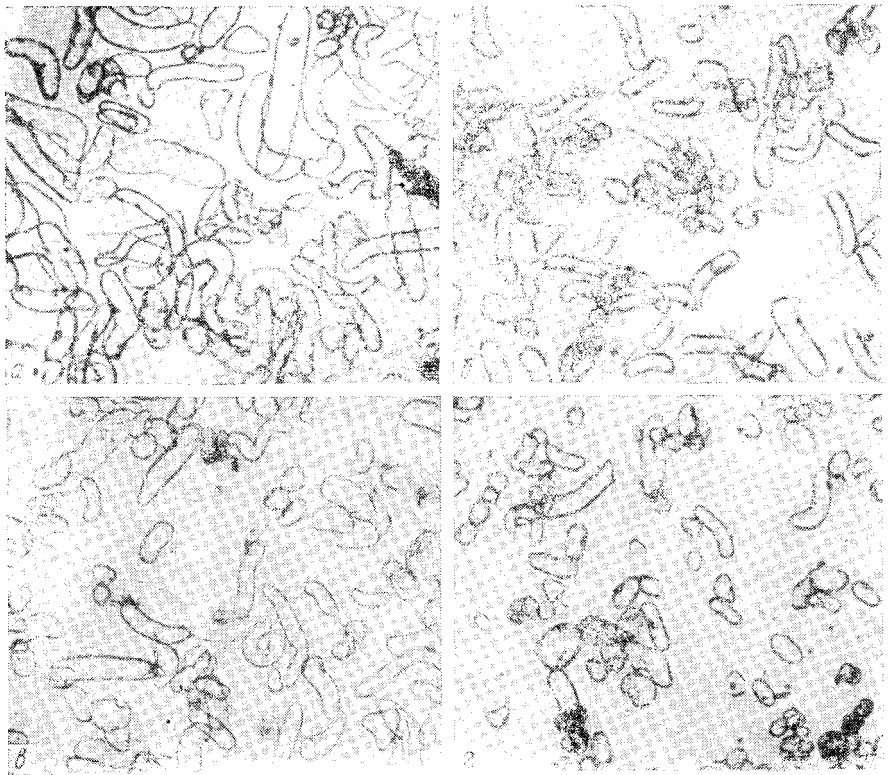


Рис. 2. Корневые клетки люцерны на 3-й день совместного культивирования с клубеньковыми бактериями различной видовой специфичности. а — с неспецифичным штаммом 144 (клубеньковые бактерии гороха); б — с изменившим специфичность мутантным штаммом 144-64; в — со специфичным штаммом 21 (клубеньковые бактерии люцерны); д — контроль, растительные клетки в неинфицированной ткани. Увел. 90×

ких — круглых и крупных — длинных форм растительных клеток в ткани. На 3-й день совместного культивирования штаммы *Rh. leguminosarum* 144 и 123, в отличие от других, вызывают образование очагов особенно удлиненных форм растительных клеток (рис. 2). После совместного культивирования в течение 30 дней во всех вариантах с бактериальной инфекцией число длинных форм растительных клеток больше, чем в контрольном

Таблица 2

Число мертвых и длинных форм растительных клеток (%) при совместном культивирования корневой ткани люцерны со штаммами клубеньковых бактерий различной специфичности

Варианты	Мертвые клетки				Длинные клетки			
	1-й день	3-й день	10-й день	30-й день	1-й день	3-й день	10-й день	30-й день
Контроль	5,3	8,0	15,6	18,0	9,5	20,7	19,8	17,3
Штамм 21	7,4	21,0	28,0	14,0	17,4	17,9	17,0	22,0
Штамм 25	16,5	14,4	19,6	14,0	4,6	20,6	18,3	21,0
Штамм 144	39,7	52,6	82,4	100,0	25,0	26,4	27,0	Мертвая ткань
Штамм 144-64	40,0	22,5	41,5	29,0	10,3	13,0	21,0	26,0
Штамм 123	26,4	36,0	42,0	88,0	23,0	24,0	16,5	37,0
Штамм 123ак9а49	7,0	18,0	35,3	23,0	7,5	20,0	18,0	34,0

стерильном варианте. Приведенные данные показывают, что удлинение растительных клеток, вызванное инфекцией *Rhizobium*, не всегда зависит от специфичности штамма.

Нами было также изучено влияние убитых культур на рост каллусов люцерны. Визуальные наблюдения и учет прироста растительной биомассы не показали заметной разницы между вариантами с убитыми культурами специфичных и неспецифичных штаммов клубеньковых бактерий.

Обобщая полученные результаты, можно сделать следующее заключение.

1. Специфичные штаммы — клубеньковые бактерии люцерны штаммы 24 и 25 не оказывают отрицательного влияния на рост каллусов люцерны и жизнеспособность растительных клеток в них.

2. Неспецифичные штаммы — клубеньковые бактерии гороха штаммы 144 и 123 угнетают рост каллусов, увеличивают число мертвых растительных клеток и вызывают гибель изолированных корневых тканей люцерны. Вместе с тем мутантные формы клубеньковых бактерий штамма 144—64 и 123ак9а49, изменившие свою специфичность, отличаются от исходных — неспецифичных штаммов значительно ослабленным патологическим влиянием на жизнеспособность растительных клеток.

3. Соотношение длинных и круглых форм растительных клеток при инфицировании корневых каллусов люцерны клубеньковыми бактериями подвергается изменениям, но не всегда зависит от специфичности штамма.

Таким образом, проведенные опыты позволяют сделать вывод о том, что совместно культивируемая система изолированных тканей корней бобовых растений и клубеньковых бактерий может служить удобной моделью для изучения явления специфичности и выяснения характера взаимоотношений между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями

Институт микробиологии
Академии наук АрмССР
Ереван

Поступило
25 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. М. Смирнов, Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре, М., 1970. ² P. H. Graham, *Fyton*, v. 25, 2, 159 (1968). ³ R. W. F. Hardy, R. C. Burns et al., *Plant and Soil*, Spec. vol., 561 (1971). ⁴ R. D. Holstein, R. C. Burns et al., *Nature*, v. 232, 5307, 173 (1971). ⁵ R. W. F. Hardy, R. D. Holsten, U. S. Pat., 3 704 546, 1972. ⁶ D. P. Carew, E. J. Staba, *Polydia*, v. 28, 1, 1 (1965). ⁷ Е. Н. Левакумова, И. О. Карапетян и др., ДАН, т. 216, № 4, 911 (1974).