

Р. Ш. АРУТЮНЯН, Н. Л. КАЛАДЖЯН, М. Д. СТЕПАНЯН,
Н. А. КАРАПЕТЯН, академик М. Х. ЧАЙЛАХЯН

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ И СУСПЕНЗИИ
ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОРНЕЙ ФАСОЛИ И ИХ ВЛИЯНИЕ
НА РОСТ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
ПРИ СОВМЕСТНОМ ВЫРАЩИВАНИИ**

В последнее время для изучения симбиотических взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий использовалось совместное культивирование клубеньковых бактерий с изолированными корнями растений⁽¹⁻⁴⁾ или с изолированными тканями и клетками корней растений⁽⁵⁻⁷⁾. Установлена даже возможность азотфиксации при совместном выращивании клеток корней сои и *Rhizobium japonicum*⁽⁸⁾. Показано также, что при совместно культивируемой системе каллусов люцерны и неспецифичных штаммов клубеньковых бактерий гороха рост каллусов задерживается, тогда как специфичные штаммы клубеньковых бактерий люцерны не оказывают отрицательного влияния на рост каллусов⁽⁹⁾. Целью настоящей работы явилось получение каллусной культуры и суспензии изолированных клеток корней фасоли и изучение их влияния на рост клубеньковых бактерий при их совместном выращивании.

Для получения стерильных корней растений фасоли семена дезинфицировали серной кислотой и по одному помещали в пробирки с экстрактом фасоли. Отобранные стерильные семена переносили в пробирки с агаровой средой Ковровцевой. Спустя 10—12 дней после прорастания семян стерильные корни растений использовали для получения изолированных тканей. Работа по получению каллусной культуры и суспензии изолированных клеток корней фасоли была начата в Лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений АН СССР, за что авторы приносят благодарность Р. Г. Бутенко и З. Б. Шаминой.

Известно, что питательная среда для получения и воспроизведения изолированных тканей не всегда является одинаковой — часто изолированная ткань, образовавшаяся на одной питательной среде, после пересева прекращает расти на этой же питательной среде. Поэтому окончательный подбор питательной среды совершается после двух или трех пересевов. Испытывали среду Гамборга и ее два измененных варианта, в которых варьировали количество макроэлементов, микроэлементов, количественный и качественный состав витаминов и ростовых веществ. Для ясности эти среды обозначены как питательные среды I, II, III; их состав приводится в табл. 1.

В табл. 2 приводятся результаты опытов по подбору оптимальной среды для получения и воспроизведения изолированных тканей из корней фасоли.

Выяснилось, что среда I является наиболее благоприятной для каллусообразования, однако при последующих пересевах она не обеспечивает рост каллусов, а после 2-го пересева рост изолированной ткани фасоли прекращается. На среде II каллусообразование протекает сравнительно слабо, но при последующих пересевах эта среда оказалась наиболее благоприятной для роста каллусов, что наглядно видно на рис. 1. Каллусы из корней фасоли — беловатого цвета, рыхлые, растут хорошо. При изуче-

нии динамики роста каллусной ткани выяснилось, что ткань из корней фасоли после каждого пересева растет в течение 4 недель, а затем в течение 5-й недели рост резко спадает; цвет каллуса меняется, он становится желтоватым, затем бурым.

Для выяснения влияния каллусов корней фасоли на рост клубеньковых бактерий в чашки Петри наливалась питательная среда, наиболее благоприятная для роста каллусов, и на ней размещались примерно одинаковые кусочки каллуса. Спустя 10 дней вокруг каллусов добавлялась суспензия односточной культуры клубеньковых бактерий. В контрольные чашки без каллусов также добавлялась суспензия бактерий. Учет роста бактерий производился спустя 1—2 суток после инкубации.

Изучение совместного роста корневых каллусов и клубеньковых бактерий на агаризованной среде показало, что испытанные различные виды клубеньковых бактерий на чистой среде или вовсе не растут, или растут очень слабо, тогда как вокруг каллусов они дают стимуляцию роста; вдали от каллусов рост бактерий такой же, как и в контроле (табл. 3).

Вокруг каллусов хорошо росли штаммы клубеньковых бактерий фасоли 680, 683, гороха 245, вики 145, тогда как штаммы клубеньковых бактерий эспарцета 821 и сои 647 совсем не росли.

Проводилось также изучение влияния корневых клеток фасоли на рост различных клубеньковых бактерий при совместном выращивании в условиях суспендиальных культур. Для получения суспензий кусочки каллусной ткани весом 1 г стерильно помещались в 250-миллиметровые конические колбы с 50 мл жидкой питательной среды и выращивались на качалках со скоростью вращения до 160 об/мин в темноте при 27—28°.

Суспендиальные культуры после 8—15-дневного выращивания заражались суспензией односточных культур разных видов клубеньковых бактерий. После 2-дневной инкубации их на качалке в термостате производился количественный подсчет клубеньковых бактерий на фасоловом агаре в чашках Петри. Результаты опытов приведены в табл. 4 и на рис. 2.

Из табл. 4 видно, что совместно с изолированными корневыми клетками фасоли хорошо растут все изученные штаммы клубень-

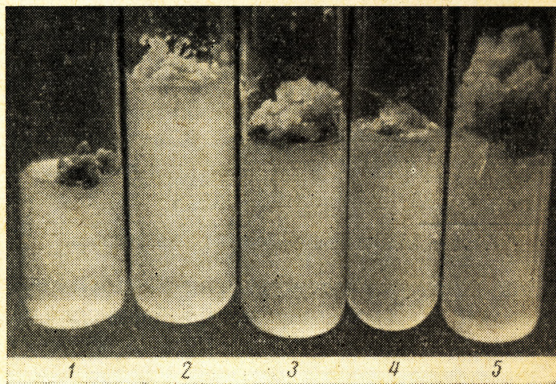


Рис. 1. Рост корневых каллусов после 2-го пересева. Образование и последующие пересевы на средах: 1 — I, I, I; 2 — I, I, II; 3 — II, II, I; 4 — III, III, II; 5 — II, II, II

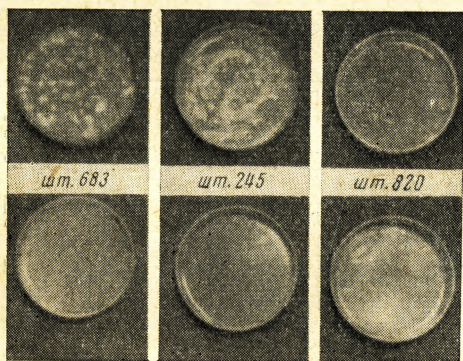


Рис. 2. Рост клубеньковых бактерий фасоли шт. 683, гороха шт. 245 и эспарцета шт. 820 при совместной культуре с корневыми клетками фасоли (верхний ряд) и без корневых клеток фасоли (нижний ряд)

Состав питательных сред для каллусной культуры

Среда I Гамборга	II	III
Макроэлементы, 1 норма Микроэлементы, 1 норма $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 норма Витаминная смесь по Гам- боргу Fe-хелат 2,4-Д * Аденин β -Индолилуксусная кислота — Гидролизат казеина Дрожжевой экстракт Сахароза Агар	Макроэлементы, 2 нормы Микроэлементы, 2 нормы $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 нормы Тиамин, пиридоксин Са-пантотенат, инозит Fe-хелат 2,4-Д* — Кинетин — — Сахароза Агар	Макроэлементы, 1 норма Микроэлементы, 1 норма $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 норма Витаминная смесь по Стаббо Fe-хелат 2,4-Д * — — Кинетин — Дрожжевой экстракт Сахароза Агар

* 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

Таблица 2

Рост каллусов корней фасоли на различных питательных средах

Периоды роста	Питательные среды		
	I	II	III
Каллусообразование	+++	++	±
Рост после первого пересева	±	+++	±
Рост после второго пересева	—	+++	±

Примечание. +++ — рост сильный, ++ — средний, + — слабый, — — роста нет.

Таблица 3

Влияние каллусов корней фасоли на рост клубеньковых бактерий

Виды клубеньковых бактерий	№ штамма	Рост клубеньковых бактерий	
		на среде без каллусов	на среде с каллусами
Фасоль	680	+	++
Фасоль	683	+	++
Люцерна	21	—	+
Горох	245	+	+++
Эспарцет	811	—	+
Эспарцет	821	—	—
Вика	145	—	+++
Соя	647	—	—

Примечание. Обозначения как в табл. 2.

Таблица 4

Действие изолированных корневых клеток фасоли на рост клубеньковых бактерий в суспендиальных культурах

Виды клубеньковых бактерий	№ штамма	Число клуб. бакт. в среде с растит. клетками, млрд/мл	Сухая биомасса клуб. бакт на среде с растит. клетками, г
Фасоль	678	1,3	29,2
	680	10,0	22,6
	683	18,9	26,6
Горох	245	17,5	31,2
	250	—	29,2
Люцерна	21	—	0,8
	811	0,76	14,0
Эспарцет	820	0,22	12,6
Соя	647	0,17	8,8

Примечание. На среде без растительных клеток роста бактерий нет.

ковых бактерий фасоли и гороха, образуя в 1 мл до 18 млрд клеток и в 1 л до 30 г сухой биомассы. В колбах образовалась очень густая и слизистая масса. Штаммы клубеньковых бактерий сои и эспарцета растут сравнительно слабо, образуя мало биомассы, и число клубеньковых бактерий в 1 мл не доходит до миллиарда. Число клубеньковых бактерий

Виды клубеньковых бактерий	№ штамма	Рост бактерий на фильтратах, полученных после роста растительных клеток		
		через 2 суток	через 4 суток	через 6 суток
Фасоль	683	+++	+++	+++
Горох	245	—	++	+++
Люцерна	21	—	+++	+++
Эспарцет	811	+++	+	—

Примечание. На среде без фильтратов роста не было. Обозначения как в табл. 2.

люцерны было весьма большим и ввиду малых размеров колоний не поддавалось учету. На рис. 2 видно, что рост клубеньковых бактерий фасоли шт. 683 и гороха шт. 245 сильный, эспарцета шт. 820 слабый; без корневых клеток фасоли роста бактерий не наблюдалось.

После этих опытов необходимо было выяснить, с чем связан сильный рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании корневых клеток и клубеньковых бактерий: обусловлен ли он непосредственно наличием живых растительных клеток или же связан с их метаболитами. Для выяснения этого вопроса корневые клетки выращивались в условиях суспендиальных культур, затем после 2, 4 и 6 суток профильтровывались через фильтр Зейца и фильтраты заражались суспензиями клубеньковых бактерий. Результаты этого опыта приведены в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что клубеньковые бактерии хорошо растут также в фильтратах суспендиальных культур. Следовательно, сильный рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании с корневыми клетками в условиях суспендиальных культур связан не с живыми клетками, а с наличием их метаболитов.

Таким образом, можно сделать следующее заключение. Оптимальной средой для получения каллусных и суспендиальных культур изолированных тканей и клеток фасоли является измененная среда Гамборга (¹¹). При совместном выращивании каллусов и клубеньковых бактерий или изолированных корневых клеток и клубеньковых бактерий в условиях суспендиальных культур клубеньковые бактерии хорошо растут только в присутствии каллусов или изолированных корневых клеток. Сильный рост клубеньковых бактерий в условиях суспендиальных культур обусловлен веществами, синтезированными и выделяемыми корневыми клетками фасоли.

Институт микробиологии
Академии наук АрмССР
Абовян

Поступило
2 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. N. Lewis, E. McCoy, Bot. Gaz., v. 95, 316 (1933). ² M. P. McConagle, Nature, v. 153, 526 (1944). ³ N. Raggio, M. Raggio, R. H. Burris, Biochim. et biophys. acta, v. 32, 274 (1959). ⁴ M. Raggio, N. Raggio, J. G. Torrey, Am. J. Bot., v. 44, 325 (1957). ⁵ I. Veliky, T. A. LalRue, Naturwiss., v. 54, 96 (1957). ⁶ R. H. Graham, Fyton, v. 25, 2, 159 (1968). ⁷ R. D. Holsten, R. C. Burns et al., Nature, v. 232, 5307, 173 (1971). ⁸ M. Reporter, N. Hermina, Biochem. and Biophys. Res Commun., v. 64, 4, 1126 (1975). ⁹ М. Г. Шамцян, Е. Н. Авакумова, М. Х. Чайлахан, ДАН, т. 222, № 3, 740 (1975).