

Н. Л. Каладжян, Р. Ш. Арутюнян,
М. Х. Чайлахян

КОРНЕВЫЕ КАЛЛУСЫ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ И РОСТ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ВЫРАЩИВАНИИ

Метод выращивания культуры изолированных растительных тканей начал интенсивно развиваться в начале 30-ых годов, открыв широкие возможности для биологических исследований в самых различных направлениях (Уайт, 1949; Бутенко, 1964). Преимущество метода заключается в том, что в условиях *in vitro* возможно строго контролировать условия опыта. Использование этого метода возможно более точно оценить потенции изолированных органов, тканей и изменять их метаболизм под воздействием разных факторов.

В последние годы этим методом начали работать также ученые, занимающиеся вопросами различных взаимоотношений симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий (Шамцян и др., 1975; Арутюнян и др., 1976; Veliky, La Rue, 1957; Graham 1968; Holsten 1971). Установлена даже возможность азотфиксации при совместном выращивании клеток корней бобовых растений с клубеньковыми бактериями (Reporter, Hermina 1975).

В последние годы в Институте микробиологии АН Армянской ССР вопросы взаимоотношений бобовых растений с клубеньковыми бактериями также изучаются с помощью совместного культивирования клубеньковых бактерий и изолированных корневых тканей бобовых растений в условиях каллусных и суспендиальных культур.

Известно, что для получения каллусных тканей механически травмированный кусочек растения помещается на питательную среду. Питательная среда должна содержать все те вещества, которые получает растение с помощью ксилемы и флоемы. Каллус образуется тогда, когда состав питательной среды, особенно состав и соотношение концентрации фитогормонов, подобран правильно.

С этой точки зрения наша цель заключалась в получении изолированных корневых тканей фасоли, гороха, сои и эспарцета с помощью подбора питательной среды и изучения их влияния на клубеньковые бактерии при совместном выращивании.

Материал и методика исследований

Для получения стерильных корней бобовых растений семена дезинфицировались серной кислотой в течение 5–10 минут. После проверки стерильности семена переносились в пробирки с агаровой средой Ковровцевой. Спустя 10–15 дней после прорастания семян стерильные корни использовались для получения изолированных тканей. Для получения изолированных каллусных тканей из корней бобовых растений нами испытывались среда Гамборга (Gamborg et al., 1968) и два измененных нами варианта этой среды, в которых варьировали количество макроэлементов, количественный и качественный состав витаминов и ростовых веществ. Среду Гамборга условно обозначили цифрой I, а видоизмененные питательные среды соответственно II и III.

При отборе оптимальной среды для получения изолированных тканей раздавленные кусочки корней бобовых растений фасоли, гороха, сои и эспарцета помещались на питательные среды в пробирках.

Для выяснения влияния корневых каллусов на рост клубеньковых бактерий в чашки Петри наливались необходимые для их роста соответствующие питательные среды и на них размещались кусочки каллусов. Спустя 10 дней вносились суспензия свежих культур клубеньковых бактерий.

Результаты исследований

Данные испытаний различных сред для образования каллусов и интенсивности их роста при пересевах приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Каллусообразование на кусочках корней бобовых растений

Корни растений	Сроки наблюдения после посадки эксплантантов, дни	Количество образованных каллусов (из 30 повторностей) на питательных средах		
		I	II	III
фасоли..	7	10	8	0
	20	13	11	3
гороха	7	2	0	7
	20	6	1	21
сои	7	2	0	10
	20	5	0	18
эспарцета	7	1	0	12
	20	4	0	23

Таблица 2

Рост корневых каллусов при пересевах

Периоды роста	Виды растений и питательные среды											
	фасоль			горох			соя			эспарцет		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Каллусообразование	+++	++	+	+	-	++	±	-	+	±	-	++
Рост после первого пересева	±	+++	+	+	-	++	-	-	++	-	-	+++
Рост после второго пересева	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++

Примечание: в табл. 2 и 3: (+++) - хороший, (++) - умеренный, (+) - слабый рост; (-) - рост отсутствует

Выяснилось, что для каллусообразования на корнях фасоли наиболее благоприятной является среда I, однако при последующих пересевах она не обеспечивает рост каллусов, а после второго пересева рост ткани прекращается. На среде II каллусообразование протекает сравнительно слабо, но при последующих пересевах эта среда оказалась наиболее благоприятной для роста каллусов (рис. 1, 2).

Для каллусообразования на корнях гороха, сои и эспарцета наиболее благоприятной является среда III, так как наибольшее

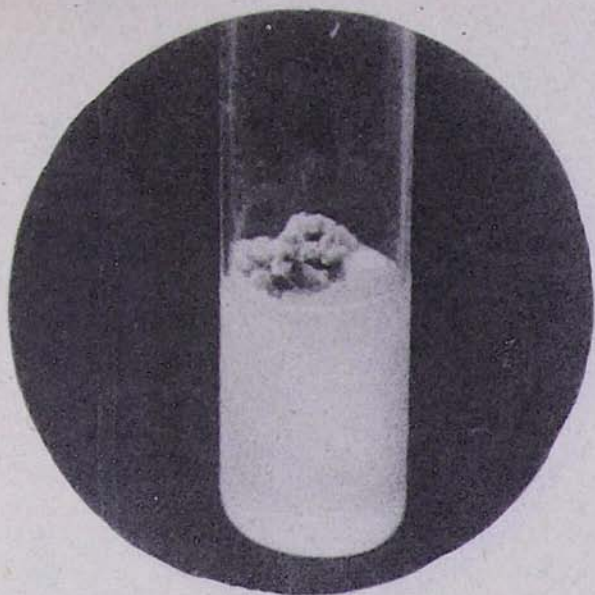


Рис. 1. Корневой каллус фасоли, образованный и пересейанный на среде Гамборга (I).

количество каллусов образовалось на этой среде. Однако при первых пересевах каллусы хорошо росли только в том случае, когда среда обогащалась разными фитогормонами и ростстимулирующими веществами.

Использованные среды позволили нам получить изолированные корневые ткани бобовых растений – фасоли, гороха, сои и эспарцета.

При изучении динамики роста каллусных тканей выяснилось, что каллусная ткань фасоли после пересева растет в течение 25–30 дней, сои и эспарцета – 35–40 дней, а гороха – до 50 дней. Однако период интенсивного роста находится в пределах 7–28 дней (рис. 3). Микроскопические исследования митотического цикла каллусных клеток показали, что самое высокое количество делящихся клеток наблюдается через 7–8 дней после пересевов. Поэтому для исследования взаимоотношений между клубеньковыми бактериями и растительными тканями или клетками используются 7–10-дневные каллусы. Данные табл. 3 показывают, что при совмест-

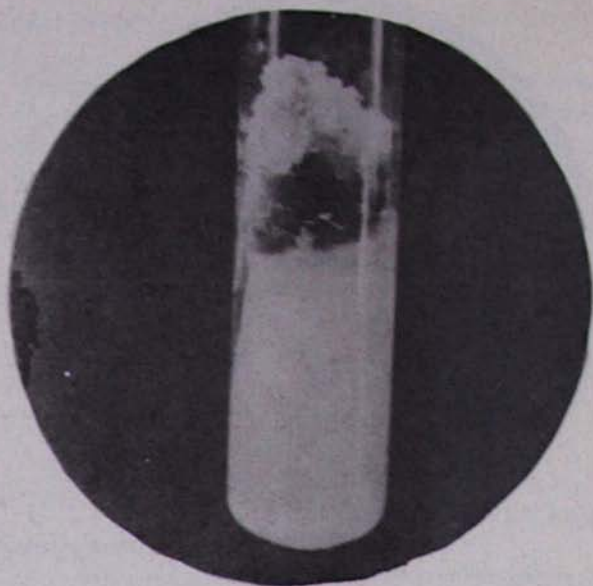


Рис. 2. Корневой каллус фасоли, образованный и пересеянный на среде II.

ном выращивании корневых каллусов и клубеньковых бактерий на агаризованной среде испытанные различные виды клубеньковых бактерий интенсивно растут вокруг каллусов, образуя зону стимуляции, а на контрольной среде (без каллуса) не растут или растут слабо. Вокруг каллусов хорошо росли клубеньковые бактерии фасоли шт. шт. №№680, 679, гороха шт. №227а и т.д. (рис. 4 и 5). Рост клубеньковых бактерий изучался также при их совместном выращивании с корневыми клетками бобовых растений в условиях суспендиальных культур. Получение суспендиальной культуры описано в нашей предыдущей статье (Арутюнян и др., 1976).

Результаты опытов, приведенные в табл. 4, 5, 6, 7, показывают, что испытанные штаммы разных видов клубеньковых бактерий без исключения очень интенсивно растут при совместном выращивании с корневыми клетками гороха, фасоли, сои и эспарцета, образуя довольно большую биомассу. В некоторых случаях клубеньковые бактерии, особенно гороха и фасоли, обра-

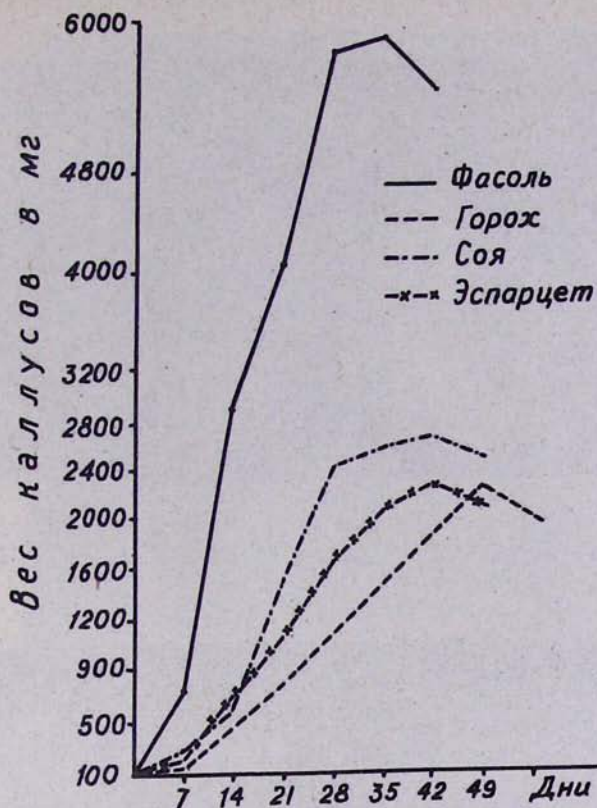


Рис. 3. Динамика роста корневых клубусов бобовых растений

— фасоль — гороха
 -.-.-.-.- соя -x-x-x-x-x- эспарцета

зуют очень густую слизистую массу, вследствие чего число этих бактерий не поддается учету (рис. 6).

В контрольных вариантах клубеньковые бактерии не растут или, в отдельных случаях, растут очень слабо.

Микроскопические наблюдения клубеньковых бактерий, выросших совместно с растительными клетками на агаризованной среде и в условиях суспендиальных культур, показали, что они имеют вид нормальных опоясанных палочек, но чуть круп-

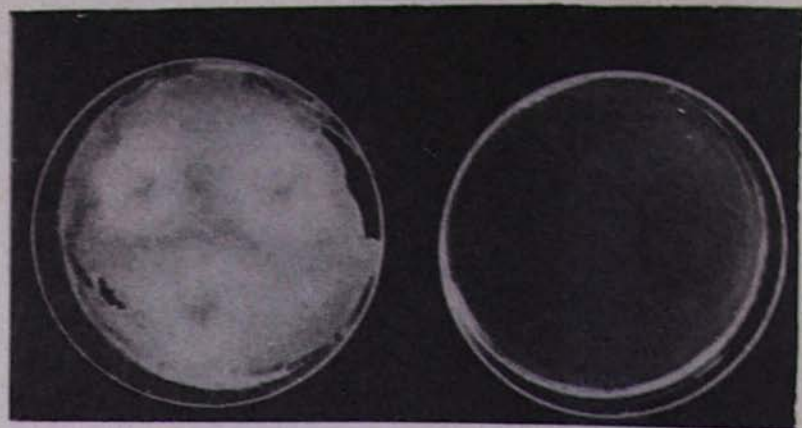


Рис. 4 Рост клубеньковых бактерий гороха, шт. 227; слева - вокруг корневых каллусов гороха; справа - контроль (без каллусов).

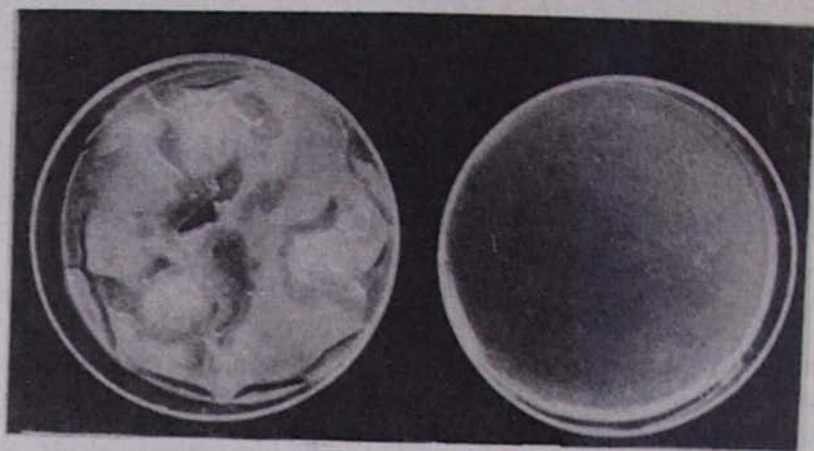


Рис. 5. Рост клубеньковых бактерий фасоли, шт. 679; слева - вокруг корневых каллусов гороха; справа - контроль (без каллусов).

нее по сравнению с контрольными культурами. Некоторые клубеньковые бактерии, особенно фасоли и гороха, образуют инкапсулированные клетки.

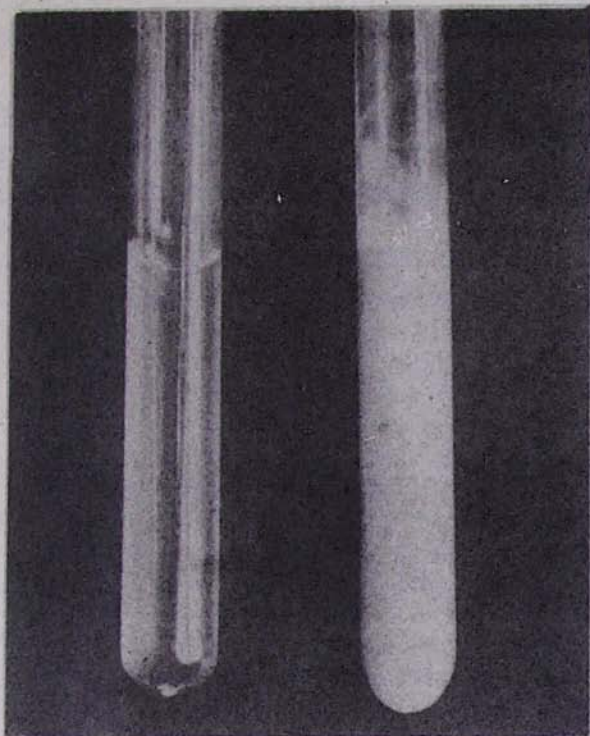


Рис. 6. Рост клубеньковых бактерий гороха, шт. 250, выращенный в суспендиальной культуре: слева – без растительных клеток; справа – с растительными клетками.

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать следующее заключение. Оптимальными средами для получения каллусных и суспендиальных культур изолированных тканей и клеток фасоли является среда II, а для гороха, сои и эспарцета – среда III с разными добавками. Разные виды клубеньковых бактерий очень интенсивно растут при совместном выращивании с корневыми каллусами и клетками фасоли, гороха, сои и эспарцета, образуя довольно много биомассы. Без растительных клеток клубеньковые бактерии не растут или растут очень слабо.

Таблица 3

Рост клубеньковых бактерий при совместном выращи-
вании с корневыми каллусами бобовых растений

Виды клубеньковых бактерий	№ № штаммов	Рост клубеньковых бактерий спустя					
		2 дня	5 дней	12 дней	контроль	вокруг каллуса	вокруг каллуса
		контроль	вокруг каллуса	вокруг каллуса	контроль	вокруг каллуса	вокруг каллуса
корневые каллусы фасоли							
Фасоль	680	-	+	+	+	+	+
	679	-	+	+	+	+	+
Соя	650	-	-	+	+	+	+
Горох	227a	+	+	+	+	+	+++
	245	+	+	+	++	+	+++
корневые каллусы гороха							
Фасоль	680	-	-	-	+	-	++
	679	-	+	-	++	-	+++
Соя	650	-	-	-	-	-	-
Горох	227a	-	-	-	+++	-	+++
	245	-	+	+	+	+	++
корневые каллусы сои							
Фасоль	680	-	-	-	-	-	+
	679	-	++	-	++	-	+++
Соя	650	-	-	-	-	+	++
Горох	227a	-	-	-	+	-	+++
	245	-	-	+	+	++	++
корневые каллусы эспарцета							
Фасоль	680					-	+++
	679					-	++
Соя	650					-	+
Горох	227a					+	+++
	250					++	+++

Таблица 4

Рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании с корневыми клетками гороха в суспендиальных культурах

Виды клубеньковых бактерий	№№ штаммов	Число клубеньковых бактерий (в тыс./мл), выращенных без растительных клеток с растительными клетками		Вес сухой биомассы, г/л
Горох	210	0	∞	35,6
	227a	0	20,5	3,6
	245	0	260,0	2,0
	250	0	∞	27,8
Фасоль	678	0	1.792,0	14,4
	679	0	19,4	4,6
	680	0	73,2	40,9
	683	6,1	315,8	22,6
Люцерна	56	0	158,8	3,6
Соя	647	0	33,6	2,4
	648	0	22,3	2,6
	649	0	54,6	3,0
Эспарцет	811	28,5	1.135,0	2,0
	821	0	48.800,0	2,0

Таблица 5

Рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании с корневыми клетками фасоли в суспендиальных культурах

Виды клубеньковых бактерий	№№ штаммов	Число клубеньковых бактерий (в млн/мл), выращенных без растительных клеток с растительными клетками		Вес сухой биомассы, г/л
Горох	210	0,065	13,0	68,0
	245	0	7.146,0	69,0
	250	0	∞	62,0
Фасоль	678	0	19.200,0	56,0
	680	0	830,4	44,6
Соя	649	0	1.892,0	4,4
Эспарцет	811	0	11.200,0	18,9

Таблица 6

Рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании с корневыми клетками сои в суспендиальных культурах

Виды клубеньковых бактерий	№№ штаммов	Число клубеньковых бактерий (в тыс./мл), выращенных без растительных клеток	с растительными клетками	Вес сухой биомассы, г/л
Горох	210	0	∞	15,4
	250	0	∞	19,0
Фасоль	678	0	144.500,0	26,0
	679	0	189,7	6,9
	680	0	16.700,0	23,6
	683	0	∞	9,2
Люцерна	21	55,9	169,0	4,8
Соя	649	0	738,8	2,8
Эспарцет	811	586,0	∞	5,6
	820	0	1.891,0	18,3

Таблица 7

Рост клубеньковых бактерий при совместном выращивании с корневыми клетками эспарцета в суспендиальных культурах

Виды клубеньковых бактерий	№№ штаммов	Число клубеньковых бактерий (в тыс./мл), выращенных без растительных клеток	с растительными клетками	Вес сухой биомассы, г/л
Горох	210	0	∞	28,6
Фасоль	679	3,0	1.680,0	13,6
	680	0	51.760,0	14,1
	683	0	2.200,0	27,1
Люцерна	21	55,9	∞	9,5
Соя	648	0	91,0	6,0
	650	0	398,0	2,6
Эспарцет	811	7,4	44,5	15,4

Ն. Լ. Քալա ջյան, Ռ. Շ. Հարությունյան, Մ. Ք. Չայլախյան

ԹԻԹԽՆԱԾԱՂԿԱՎՈՐ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԱՐՄԱՏԱՅԻՆ ԿԱԼՈՒՍՆԵՐԻ ԵՎ
ՊԱԼԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՃԸ ՆՐԱՆՑ ՀԱՄԱՏԵՂ ԱՃՅՑՈՂՈՒԹՅԱՆ
ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Գամբորգի սննդամիջավայրի հիմքի վրա մշակվել են սննդամիջավայրեր լորու, ոլոռի, սոյայի և կորնզանի արմատային հյուսվածքների ստացման և վերարտադրման համար:

Ագարային և սուսպենդիալ կուլտուրայի պայմաններում թիթեռնածաղկավոր բույսերի արմատային կալուսների ու բջիջների և տարբեր տեսակի պալարաբակտերիաների համատեղ աճեցողության ժամանակ, պալարաբակտերիաները աճում են ինտենսիվորեն: Ըստ որում ստուգիչ սննդամիջավայրերում (առանց արմատային կալուսների ու բջիջների) պալարաբակտերիաները չեն աճում և կամ աճում են թույլ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

Арутюнян Р. Ш., Кападжян Н. Л., Степанян М. Д., Карапетян Н. А., Чайлахян М. Х. 1976. ДАН СССР, 229, 5.

Бутенко Р. Г. 1964. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.

Уайт Ф. Р. 1949. Культура растительных тканей. М., Изд. ИЛ.

Шамцян М. Г., Аввакумова Е. Н., Чайлахян М. Х. 1975. ДАН СССР, 222, 3.

Holsten R. D., Burns R. C., Hardy R. W. F., Hebert R. R. 1971. Nature, 232, 5307.

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Exptl. Cell. Res. 50.

Graham R. H. 1968. Fyton, 25, 2.

Reporter M., Hermina N. 1975. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 4.

Veliky., La Rue T. A. 1957. Naturwiss., 54, 96.