

УДК 579.64.631+581.133.1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Дж. А. Агаджанян, М. Г. Шамцян, Ф. Р. Казарян, Ю. Г. Попов

Бобово-ризобиальные перевиваемые ассоциации

(Представлено академиком АН Армянской ССР В. О. Казаряном 6/III '98)

В литературе известны многочисленные успешные попытки создания азотфиксирующих ассоциаций культур тканей бобовых и небобовых растений с симбиотическими и несимбиотическими дназотрофами. Однако сообщения об ассоциациях, способных к длительному субкультивированию при сохранении жизнеспособности обоих партнеров, единичны: в каллюсах сахарного тростника клеток *Azospirillum brasilense* (¹), маркови *Azotobacter vinelandii* (²), табака *Aplysiopsis variabilis* (³). Сведений же о культивировании перевиваемых бобово-ризобиальных ассоциаций *in vitro* в литературе мы не встречали.

С целью стабилизации симбиотических взаимоотношений культуры тканей люцерны и *Rhizobium meliloti*, взаимной адаптации бактериальных и растительных клеток в условиях смешанной культуры нами была предпринята попытка создать жизнеспособные перманентные ассоциации *in vitro*, перевиваемые в течение многократных пассажей. В качестве микросимбионта ассоциации использовали клубеньковые бактерии люцерны шт. 21/67 (коллекционная культура Института микробиологии АН Армянской ССР), макросимбионта — культуру ткани люцерны сорта «Апаранская-40», изолированная нами и поддерживаемая в течение длительного субкультивирования. Культура ткани люцерны и ее ассоциация с *Rh. meliloti* поддерживалась на модифицированной среде Гамборга В-5—МВ-5 (⁴). Пересадки ассоциаций осуществляли через каждые 3—4 недели. Оптимальное соотношение клеток микро- и макросимбионтов было 10^7 — 10^8 бактериальных клеток на 1 г растительной ткани.

В этих постоянных ассоциациях *in vitro* изучали жизнеспособность обоих симбионтов, учитывали их ростовые показатели, определяли активность нитрогеназы клубеньковых бактерий в течение пассажей, проводили цитоморфологические наблюдения. Нитрогеназную активность определяли газохроматографическим методом по восстановлению ацетилена в этилен на хроматографе марки «Цвет—110», по методике, подробно описанной ранее (⁵). Жизнеспособность макро- и микросимбионтов устанавливали по приросту биомассы и наличию жизнеспособных клубеньковых бактерий, количественно определяемых по числу образовавшихся колоний на бобовом агаре. Сравнительные цитоморфологические наблюдения макро- и микросимбионтов проводили как в условиях ассоциации, так и при культивировании на питательных средах МВ-5 и бобовом агаре. Бактериальные клетки микроскопиро-

вали как прижизненно, так и после их фиксации (по Буэну) и окрашивания (кристаллическим фиолетовым). Микроскопирование и микрофотографирование бактериальных и растительных объектов проводили с помощью микроскопа марки МБН-6. Микрофотографии получены на фотопленке «Микрат-200».

Каллюс люцерны, культивируемый в период всего жизненного цикла совместно с клетками *Rh. meliloti*, в условиях ассоциации сохранял жизнеспособность в течение 17-и пассажей. На рис. 1 изобра-



Рис. 1. Внешний вид перевиваемой ассоциации каллюсов люцерны с клубеньковыми бактериями

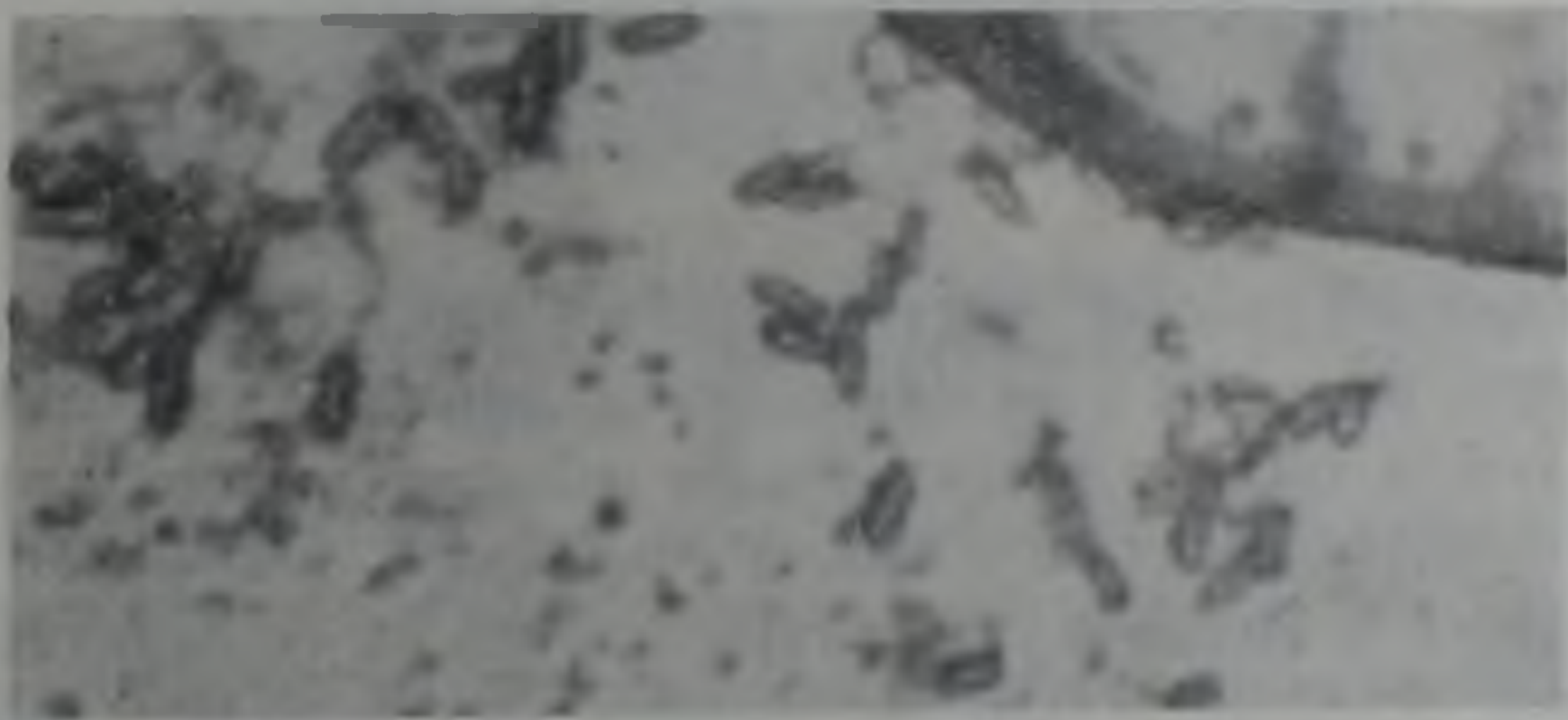


Рис. 2. Палочковидные формы клубеньковых бактерий в ассоциации с каллюсом люцерны. Окраска по Гутштейну. Внизу виден фрагмент растительной клетки.

X 2500

жен каллюс люцерны, инфицированный клубеньковыми бактериями, в конце субкультивирования. Внешние морфологические различия между каллюсами ассоциаций и контрольных, неинкулированных бактериями вариантов не выявлены в течение всех пассажей. В ассоциациях и неинкулированных вариантах каллюсы люцерны имели одинаковую рыхлую консистенцию и светло-желтый цвет. В обоих случаях не наблюдалось признаков преждевременного некроза, побурения тканей. Наличие бактериальных клеток в ткани визуально не обнаруживается в течение субкультивирования ассоциаций. Только после длительного

хранения без пересадки (более двух месяцев) каллюсы, перманентно носящие в себе клубеньковые бактерии, приобретают более бурый оттенок, чем контрольные—неинокулированные, и вокруг них наблюдается бактериальный рост. В ассоциативной ткани незначительно повышается содержание сухих веществ по отношению к контролю (5,0—5,2 против 4,5—4,7).

В течение субкультивирования контролировалось количество клубеньковых бактерий в ассоциативной ткани—оно составляло 10^6 — 10^9 клеток на 1 г каллюса. Угнетение растительной ткани отмечалось, когда в 1 г каллюса количество бактерий превышало 10^9 . Результаты учета ростовых показателей растительных тканей, определения нитрогеназной активности в течение субкультивирования ассоциаций обобщены в таблице.

Показатели роста и нитрогеназная активность (нМ этилена на 1 г сухого вещества в течение 24 ч) в течение субкультивирования переносимых ассоциаций клеток клубеньковых бактерий и каллюсов люцерны

№ пассажа	Прирост биомассы, г		Индекс роста		Нитрогеназная активность, нМ C_2H_4 /г сухого вещества
	ассоциация	контроль	ассоциация	контроль	
I	3.29	2.70	8.2	6.8	29
II	3.30	3.83	8.3	9.6	61
V	5.83	5.63	14.6	14.1	—
VI	7.87	7.86	19.7	19.7	55
VII	9.07	8.30	22.7	20.8	—
VIII	8.79	8.43	22.0	21.1	—
IX	3.98	4.35	10.0	10.9	—
X	6.22	7.96	15.6	19.9	53
XIV	4.08	4.35	10.5	11.9	71
XV.1	4.18	4.57	10.5	11.4	35

Приведенные данные свидетельствуют, что постоянное присутствие клубеньковых бактерий в культуре ткани люцерны в течение 17-и пассажей не угнетало роста растительного компонента ассоциации. Индекс роста (отношение конечного веса к исходному) и прирост биомассы ассоциативных и неинокулированных тканей в большинстве случаев сохранялись приблизительно на одинаковом уровне. Значительные расхождения по росту тканей отмечаются между различными пассажами. Минимальное увеличение роста как ассоциативных, так и неинокулированных тканей наблюдается во время первых пассажей, а максимальное—7-го и 8-го. Индекс роста ассоциативной ткани достигает максимума (22,7) к концу 7-го пассажа, а каллюсов без бактерий (21,1)—8-го.

Нитрогеназная активность клубеньковых бактерий шт. 21/67 в ассоциации с клетками люцерны в период субкультивирования обнаруживается не всегда и не связана с темпами роста ассоциации. Уровень активности нитрогеназы незначителен.

Цитоморфологическими исследованиями установлено, что клубеньковые бактерии в растительной ткани при длительном пассировании мало отличаются от клеток, культивируемых на традиционных пита-

тельных средах. Они имеют характерную для *Rhizobium* палочковидную форму (рис. 2). Однако эти клетки по форме и размерам отличаются от бактериондов, находящихся в клубеньковой ткани растения-хозяина. Атипичные формы клубеньковых бактерий, часто встречающиеся на средах для культивирования растительных клеток, при их совместном росте с тканью не обнаруживаются.

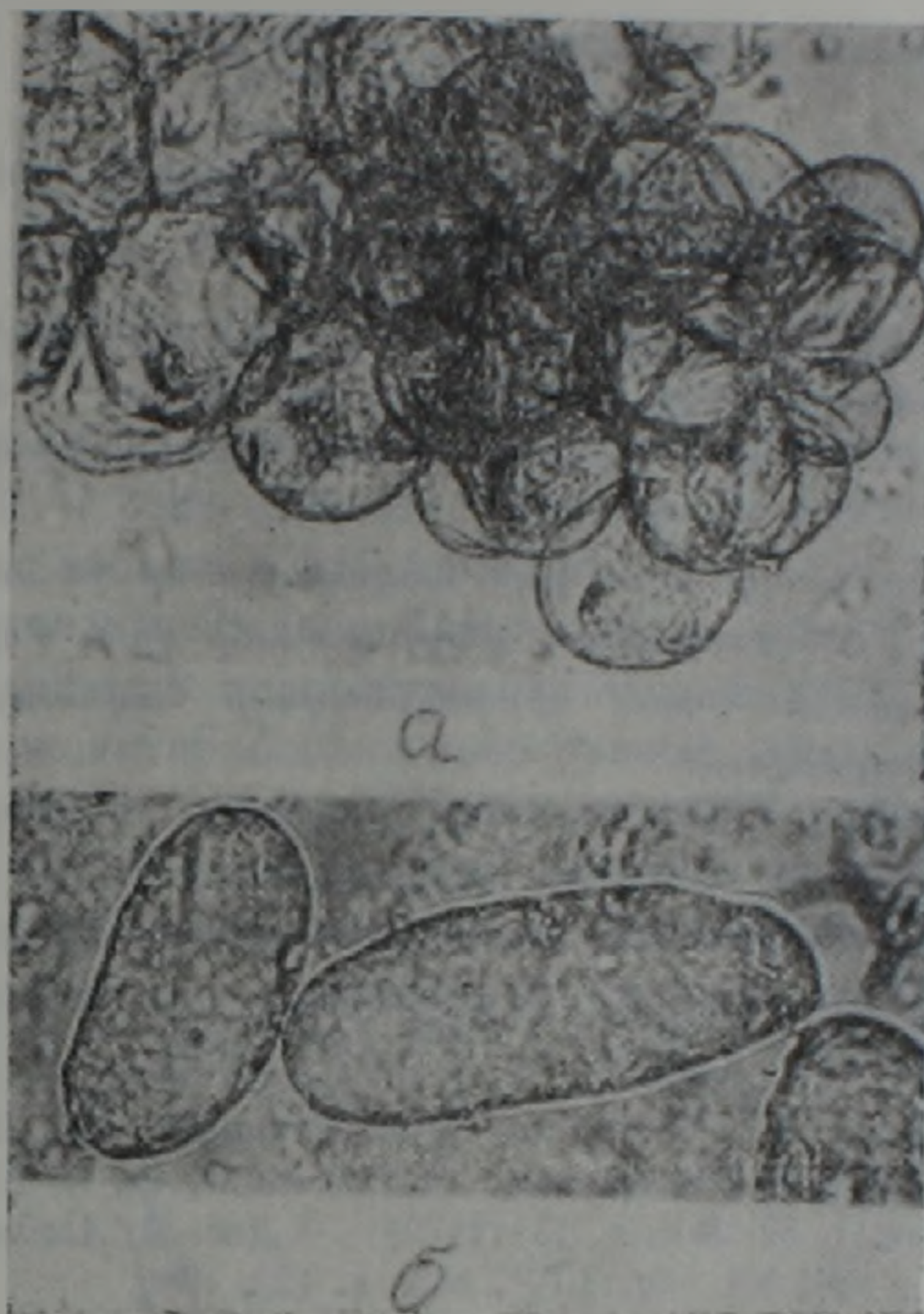


Рис. 3. Растительные клетки в ассоциации с клубеньковыми бактериями: а—меристематические, б—паренхимные клетки. X 200

Как для ассоциаций, так и каллюсов без бактерий характерны два основных типа растительных клеток—меристематические и паренхимные (рис. 3, а, б). Соотношение их меняется по мере старения ткани.

Итак, между партнерами ассоциации не наблюдается антагонизма, однако уровень симбиотической азотфиксации незначителен. Вероятно, при длительном культивировании постоянных ассоциаций *Rh. meliloti* шт. 21/67 и культуры ткани люцерны вместо типичных мутуалистических бобово-ризобияльных взаимоотношений устанавливаются комменсальные.

Менее успешной оказалась попытка создания перевиваемой ассоциации, в которой в качестве микросимбионта использовали клубеньковые бактерии люцерны шт. 441а (из коллекции культур микроорганизмов ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии). Эта комбинация партнеров в ассоциации сохранила жизнеспособность только в течение трех пассажей. Количество бактериальных клеток на 1 г каллюса в

течение субкультивирования постепенно увеличивалось от 10^7 до 10^9 и более К концу третьего пассажа, когда в 1 г каллюса количество клубеньковых бактерий превышало 10^9 , наблюдалось сильное угнетение макросимбионта, и рост ассоциации прекращался.

Ереванский государственный университет

Ջ. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Մ. Կ. ՇԱՄՅԱՆ, Յ. Ի. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, ՅՈՒ. Գ. ՊՈՊՈՎ

Խիթենաձավկավորների և պալարաբակտերիաների փոխազանցների ենթակվող ասոցիացիաներ

Ստեղծված է աուլույտի արմատային ծագման հյուսվածքային կուլտուրայի և պալարաբակտերիաների ասոցիացիա, որի մակրո- և միկրոսիմբիոնտները պահպանում են իրենց կենսոնակությունը տեական փոխազանքերի ընթացքում:

Պալարաբակտերիաների մշտական աուկայությունը բուսական հյուսվածքում բացասաբար չի անդրադառնում վերջինիս աճի վրա: Փոխազանքերի ընթացքում այս ասոցիացիաներում նիտրոգենազայի հավաստի ակտիվություն չի միշտ է հայտնաբերվում:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱՎԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ P. S. Carison, R. S. Chaleff, Nature, v. 252, № 5432, p. 393 (1974). ² V. Vasil, J. K. Vasil, D. A. Zuberer, c. 1, Z. pflanzenphysiol., v. 95, p. 141 (1979). ³ Т. Г. Корженевская, Л. В. Пивоварова, О. И. Баулича и др., ДАН СССР, т. 274, № 4, с. 1016 (1974). ⁴ З. В. Маришвина, О. Г. Севрук, Е. И. Щербакова и др., Биол. журн. Армении, т. 32, № 6, с. 13 (1979). ⁵ Дж. А. Агаджанян, Ю. Г. Попов, М. Г. Шамяян и др., Уч. зап. ЕГУ, № 2, с. 122, 1985