

Е. Н. Авакумова, М. В. Овсепян,
Т. У. Степанян

ИЗМЕНЕНИЕ НУКЛЕОИДОВ У КРУПНОКЛЕТОЧНЫХ МУТАНТНЫХ ФОРМ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МИТОЗНЫХ ЯДОВ

В настоящее время установлена возможность возникновения полиплоидных форм у микроорганизмов под воздействием митозных ядов.

Большая степень изменчивости у полиплоидных форм дрожжей по сравнению с гаплоидными (Имшенецкий, Кондратьева, 1972, 1976, 1977; Имшенецкий, Солнцева, 1974; Кондратьева, 1977), а также повышенная активность ферментов (Имшенецкий, Кондратьева, 1968) дают возможность отбирать штаммы с полезными свойствами.

Прямое определение пloidности путем подсчета хромосом у микроорганизмов осуществить невозможно. Поэтому используются некоторые косвенные признаки — размеры клеток и ядра, количество ДНК на клетку, а также устойчивость к УФ-облучению.

Изучению полиплоидии у бактерий посвящено меньше работ, чем у дрожжей. Тем не менее, под воздействием митозных ядов были получены стабильные крупноклеточные формы *Pasteurella pestis*, *Escherichia coli* (Won, 1950; Ogg, Zelle, 1957 — цит. по Брауну, 1968), *Sorangium cellulosum*, *Pseudomonas melochlora* (Имшенецкий, Жильцова, 1966, 1969), которые на основании ряда признаков были отнесены к полиплоидам.

Крупноклеточные, гигантские формы клубеньковых бактерий клевера и сои получили Наундорф и Нильсон (Naundorf, Nils-

son , 1943) при совместном выращивании их с азотобактером. Под влиянием полиплоидогена — колхицина повышается вирулентность мало вирулентного штамма клубеньковых бактерий люцерны (Schiel et al., 1963).

Цель настоящей работы — выявить полиплоидную природу крупноклеточных мутантов клубеньковых бактерий гороха и люцерны, полученных с помощью митозных ядов.

Материал и методика исследований

Для получения крупноклеточных мутантов клубеньковых бактерий были использованы штаммы *Rhizobium leguminosarum* — №№36, 65, 123 и 144 и *Rhizobium meliloti* — №№21/49, 25, 26.

В качестве полиплоидогенов применялись колхицин (0,1 — 2%), камфора, аценафтен (10–50 мг на чашку Петри), а также совместное выращивание клубеньковых бактерий с *Azotobacter chroococcum*. Продолжительность воздействия полиплоидогенов от 1 до 25 суток.

Крупноклеточные формы отбирались путем микроскопирования культуры из отдельных колоний.

Измерение клеток проводилось по серии фотографий, сделанных в одном увеличении. Объем рассчитывался по формуле для цилиндра.

Нуклеоиды также измерялись по серии фотографий. Измерение проводилось по оси в 2-х направлениях и объем рассчитывался по формуле для эллипсоида вращения. Для измерения нуклеоидов в процессе роста культуры, препараты готовились из одной колонии (методом отпечатков) через каждые 10 минут. Затем препараты фиксировались жидкостью Карнуа и окрашивались по методу Робиноу с HCl — гидролизом.

Количество крупных клеток в культуре подсчитывалось при микроскопировании, для чего учитывалось не менее 2 тысяч клеток. Содержание ДНК на клетку определялось по методике Дише в модификации Де Ляматера (1960).

Результаты исследований

Отбор крупноклеточных форм клубеньковых бактерий проводился из отдельных колоний после воздействия на культуры полиплоидогенов. Из 2300 просмотренных колоний клубеньковых бактерий было выделено 66 крупноклеточных форм *Rhi*—

Таблица 1

Получение крупноклеточных мутантных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны

Исходные штаммы	Всего	Количество полученных стабильных мутантных форм с помощью полиплоидогенов									
		совмест- ное куль- тивирование с азотобак- тером	кол- хитин	аце- наф- тен	кам- фора	комбинированная обработка азотобак- тери кам- форы	аце- наф- тен	кам- фора	комбинированная обработка азотобак- тери кам- форы	аце- наф- тен	кам- фора
123 Rh. leguminosarum	21	4	1	0	2	13	1	0	0	0	0
65 Rh. leguminosarum	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
36 Rh. leguminosarum	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Всего	24	4	2	2	2	13	1	0	0	0	0
26 Rh. meliloti	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
25 Rh. meliloti	11	1	4	2	4	0	0	0	0	0	0
21 Rh. meliloti	17	0	3	4	3	3	0	0	4	4	4
Всего	30	1	7	7	8	3	0	0	4	4	4
Всех культур по двум видам	54	5	9	9	10	16	1	0	4	4	4

zobium leguminosurum и 43 — *Rhizobium meliloti*, которые вместе составляли 4,7% от всех рассмотренных.

Через 1–5 лет после выделения первоначальные свойства сохранили 24 культуры клубеньковых бактерий гороха и 30 культур клубеньковых бактерий люцерны, т. е. половина всех выделенных штаммов (табл. 1).

Частота возникновения крупноклеточных мутантов для различных штаммов клубеньковых бактерий не одинаковая. Из данных табл. 1 видно, что наибольшее количество крупноклеточных форм получено у штаммов №123 (21 мутант) и №21 (17 мутантов), а наименьшее — у штаммов №№26, 36, 65 (1 — 2 мутанта), Штамм №144 совсем не дал измененных по размеру форм. Подобные данные приведены и в работе Имшенецкого и Жильцовой. Только при повышении проницаемости клеток им удалось получить временное увеличение размера клеток у *Micobacterium rubrum* (Имшенецкий, Жильцова, 1973), в то время как другие культуры дали стабильные крупноклеточные формы (Имшенецкий, Жильцова 1966, 1969).

Кроме того, выявлены различия между отдельными полиплоидогенами по способности индуцировать возникновение крупноклеточных форм. Наибольшее количество крупноклеточных мутантов у клубеньковых бактерий гороха получено при комбинированном воздействии полиплоидогенов — азотобактера и колхицина, у люцерны — с помощью колхицина, камфоры, аценафтена.

Измерение клеток клубеньковых бактерий показало, что у мутантных форм они более крупные, чем у исходных штаммов (рис. 1, табл. 2). Если объем клеток исходного штамма клубеньковых бактерий гороха №123 составляет 0,23 — 0,68 мкм³, то у мутантов — 0,39 — 2,8 мкм³ (штамм №123 к 59), 0,47 — 1,71 мкм³ (штамм №123а к 49), 0,61 — 1,79 мкм³ (штамм 123а60). У клубеньковых бактерий люцерны объем клеток мутантов колеблется от 0,19 до 1,04 мкм³, в то время как у исходного штамма №21 — от 0,1 до 0,51 мкм³. На более крупные размеры клеток у полиплоидных форм микроорганизмов по сравнению с гаплоидными ссылаются многие авторы (Попова, 1966; Косиков и др. 1975; Lindegren, Lindegren, 1951 и др.). Они подтверждают положение о том, что с увеличением степени пloidности увеличивается объем клетки.

Клубеньковые бактерии в культуре отличаются большим полиморфизмом, содержат клетки различных размеров. Подсчет количества крупных клеток указывает на большее их количество

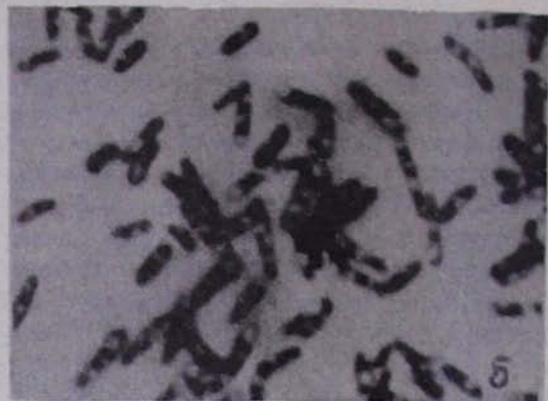


Рис. 1. Морфология клеток клубеньковых бактерий гороха, фиксация жидкостью Буэна, окраска по Гутштейну; а) исходный штамм №123; б) полиплоидный штамм №123ак₉₄₉. Увеличение в 3500 раз.

во у мутантных форм по сравнению с исходными штаммами (табл. 2).

Наиболее достоверными косвенными признаками определения пloidности у микроорганизмов могут быть увеличение объема нуклеоидов и количества ДНК на клетку.

Средний объем одного нуклеоида у крупноклеточных мутан-

тов клубеньковых бактерий гороха и люцерны в 2-3 раза больше, чем у исходных штаммов (рис. 2, 3, табл. 2, 3, 4). В про-

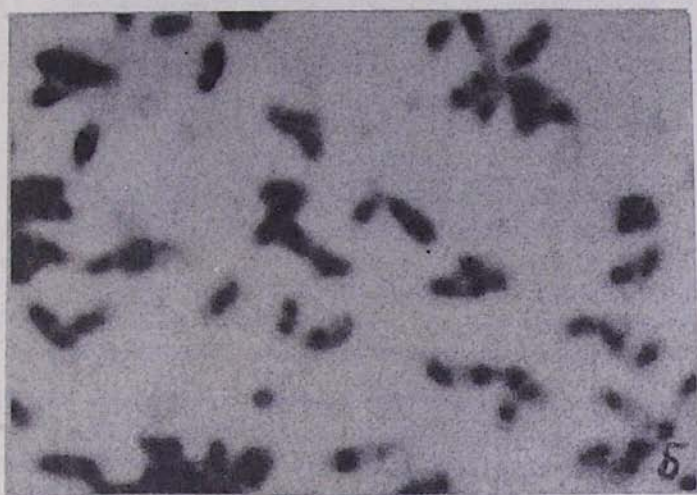


Рис. 2. Нуклеоиды в клетках одноступенчатой культуры клубеньковых бактерий гороха, окраска по Гимза; а) исходный штамм 123; б) полиплоидный штамм №123аа₄₈. Увеличение в 4000 раз.

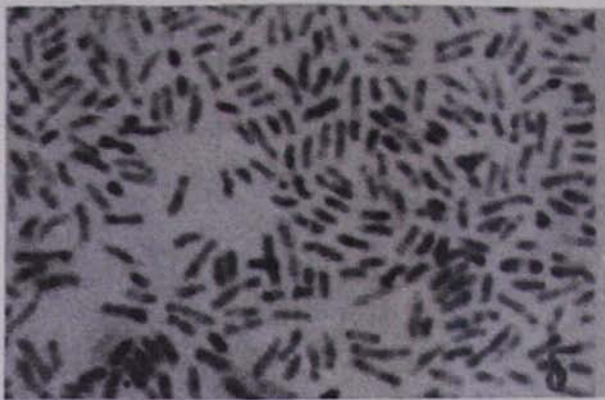


Рис. 3. Нуклеоиды в клетках трехсуточной культуры клубеньковых бактерий люцерны, окраска по Гимза; а) исходный штамм №21; б) полиплоидный штамм №21a₂k₂. Увеличение в 2800 раз.

цессе роста и развития культур объем нуклеонидов изменяется, тем не менее он всегда больше у мутантов (табл. 3, 4).

Определение количества ДНК на клетку у полученных измененных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны показало, что оно в 2–3 раза превышает количество ДНК у исходных штаммов. Несмотря на изменение количества ДНК в процессе роста культур, наивысшее содержание ее остается также у крупноклеточных мутантов (табл. 2).

О повышенном содержании ДНК на клетку у полиплоидных

Характеристика полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха и люцерны
(3-суточная культура)

Штаммы	Объем 3 клеток, Объем одного ядра мкм		Количество крупных кле-ток в культу-ре, %	ДНК в клетках через 1-5 лет хранения куль-тур, мкг/млрд. клеток	
	мкм	средний			
<i>Rhizobium leguminosarum</i>					
123 - исходный	0,23	- 0,68	0,07	0,079	13,8
123a ⁶⁰ - полиплоидный	0,61	- 1,79	0,16	0,20	35,4
123aa ⁴⁸ - полиплоидный	0,29	- 1,29	0,16	0,23	43,7
123ак ⁴⁹ - полиплоидный	0,47	- 1,71	0,20	0,15	39,2
123к ⁵⁹ - полиплоидный	0,39	- 2,18	0,14	0,16	26,3
123ак ³¹ - полиплоидный	0,36	- 1,03	0,16	0,17	51,16
<i>Rhizobium meliloti</i>					
21 - исходный	0,1	- 0,51	0,034	данных нет	12,6
21a _к ² - полиплоидный	0,19	- 0,98	0,096	- "	16,9
21тк ₂ ² - полиплоидный	0,29	- 0,84	0,070	- "	16,1
21тк ₃ ² - полиплоидный	0,21	- 1,04	0,089	- "	19,8
21тс _к ² - полиплоидный	0,23	- 0,84	0,082	- "	17,8

Таблица 3

Объем нуклеонидов у крупноклеточных мутантных форм клубеньковых бактерий гороха в процессе роста

Штаммы	Средний объем од- ного нук- леоида, мкм ³	Возраст культуры					
		1 час	3 часа	4 часа	24 часа	72 часа	25 суток
123-исход- ный	общий	0,046	0,066	0,050	0,077	0,070	0,060
	в одноя- дерных клетках	0,066	0,050	0,046	0,029	0,079	0,060
123а ₆₀ - мутант	общий	0,140	0,150	0,140	0,140	0,160	0,090
	в одноя- дерных клетках	-	0,180	0,230	0,190	0,200	0,090
123аа ₄₈ - мутант	общий	0,075	0,110	0,190	0,140	0,160	0,150
	в одноя- дерных клетках	0,084	0,190	0,150	0,160	0,230	0,110

Таблица 4

Объем нуклеонидов у крупноклеточных мутантных форм клубеньковых бактерий люцерны (отпечатки из одной колонии с интервалом 10 мин.)

Штаммы	Средний объем одного нуклеоида в процессе рос- та культуры, мкм ³ (по срокам)					
	1	2	3	4	5	6
21-исходный	0,021	0,029	0,03	0,027	0,026	0,023
21а _{2к2} -му- тант	0,069	0,069	0,083	0,079	0,078	0,084
21тк ₃ - му- тант	0,049	0,056	0,057	0,054	0,054	-
21тс _{3к2} - мутант	0,045	0,043	0,043	0,045	0,047	0,048
21тс _{3к4} - мутант	0,046	0,054	0,047	0,046	0,038	0,054

микроорганизмов имеются сообщения во многих работах (Имшенецкий, Жильцова, 1969; Ogur et al., 1952, 1955, и др.). При этом количество ДНК у полиплоидных культур должно быть увеличенным в кратное число раз.

Вышеописанные признаки – размер клеток, объем нуклеоидов и количество ДНК на клетку указывают на то, что полученные с помощью полиплоидогенов крупноклеточные мутанты клубеньковых бактерий можно считать полиплоидными формами.

Не все штаммы сохранили свойства полиплоидов, но отдельные из них удерживают эти признаки в течение ряда лет.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение о том, что стабильные полиплоидные формы у клубеньковых бактерий гороха и люцерны могут возникнуть под воздействием митозных ядов.

Ե. Ն. Ավվախուժովա, Մ. Վ. Հովսեփյան, Տ. Հ. Ստեփանյան

ՆՈՒԿԼԵՈՒԴՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՄԻՓՈԶԱՅԻՆ
ԹՈՒՅՆԵՐԻ ՕԳՆՈՒԹՅԱՄԲ ՍՏԱՑՎԱԾ ՊԱԼԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ
ԽՈՇՈՐ ԲՅԻՋՆԵՐ ՈՒՆԵՑՈՂ ՄՈՒՏԱՆՏԱՅԻՆ ՁԵՎԵՐԻ ՄՈՏ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Միթոզային թուլների ազդեցության տակ, ինչպես նաև՝ ազոտաթափանքների հետ համատեղ աճման պայմաններում ստացվել են ոլորի և առվույտի պալարաբակտերիաների մուտանտներ, որոնք ըստ մի չափք հատկանիշների՝ բջիջների չափերի, նուկլեոիդների ծավալի և մեկ բջջում ընդհանուր քանակության կարող են համարվել պոլիպլոիդ ձևեր:

Л И Т Е Р А Т У Р А

Браун В. 1968. Генетика бактерий. М.

Де Ляматер Е. Д. 1960. В сб.: Анатомия бактерий. 237.

Имшенецкий А. А., Жильцова Г. К. 1966. Z. Allg. Mikrobiol., 6.

Имшенецкий А. А., Жильцова Г. К., 1969. ДАН СССР, 188, 2.

Имшенецкий А. А., Жильцова Г. К. 1973. Микробиология, 42, 6.

Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1968. Микробиология, 37, 5.

- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1972. Микробиология, 41, 3
- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1976. Микробиология, 45, 1.
- Имшенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф. 1977. Z. Allg. Mikrobiol., 17, 1.
- Имшенецкий А. А., Солнцева Л. И. 1974. Ann. mikrobiol. and enzymol., 24, 2.
- Кондратьева Т. Ф. 1977. В сб.: Успехи микробиологии. 12.
- Косиков К. В., Раевская О. Г., Хорошуткина Э. Б., Перевертайло Г. А. 1975. Микробиология, 45, 4.
- Попова Л. С. 1977. Микробиология. 35, 3.
- Lindegren C. C., Lindegren G. 1951. J. Gen. Microbiol., 5.
- Naundorf G., Nilsson R. 1943. Naturwissensch., 31, 29/30.
- Ogur M. 1955. J. Bacteriol., 69.
- Ogur M., Minckler S., Lindegren G., Lindegren C. C., 1952. Arch. Biochem. Biophys., 40.
- Schiel E., De Olivero E. L. G., Dieguez R. N., Pachero J. C., Enokida E. 1963. Ann. Inst. Pasteur., 105, 2.
- Won W. D. 1950. J. Bacteriol., 60.