

Е. Н. АВВАКУМОВА, М. В. ОВСЕПЯН, И. О. КАРАПЕТЯН, Т. У. СТЕПАНЯН

МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТОВ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM В СВЯЗИ С ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Изучались особенности мутантных форм *Rhizobium leguminosarum*, изменивших специфичность к растению-хозяину. Мутанты, образовавшие клубеньки на люцерне, имели более мелкие клетки, замедленный рост, отличались от родительского штамма усвоением тех или иных углеводов, органических кислот, наличием и локализацией в клетках полисахаридов, белков. Усиление у мутантов свойств новой специфичности путем пассажа через люцерну привело к изменению содержания полисахаридов, кислых белков и липидов в клеточной оболочке.

В последнее время многие исследователи отмечают, что повышение резистентности мутантов клубеньковых бактерий к отдельным антибиотикам приводит к изменению свойств вирулентности или азотфиксирующей активности. Мутанты с повышенной устойчивостью к стрептомицину, каномоцину, неомицину и вюмицину теряют свою эффективность [1—5]. По другим данным, устойчивость к некоторым антибиотикам не связана с потерей эффективности [6, 7].

Кроме того, в литературе есть указания на изменение симбиотических свойств, т. е. специфичности клубеньковых бактерий к растению-хозяину под влиянием химических мутагенов, а также в результате трансформации ДНК [8, 9].

Цель настоящей работы—изучение некоторых морфо-физиологических и цитохимических особенностей клубеньковых бактерий в чистой культуре, связанных с изменением их специфичности в результате мутагенеза.

Материал и методика. В качестве исходной культуры для получения мутантов использовался штамм клубеньковых бактерий № 144, активный и специфичный для гороха.

Для индуцирования образования мутантов применялся супермутаген-N-нитрозо-N-метилмочевина в концентрации 0,2%, при экспозиции—3 часа, выживаемости культуры—5,2%. Мутанты выделялись по резистентности к антибиотикам: пенициллину, эритромицину, хлортетрациклину.

Вирулентность и специфичность выделенных мутантов проверялась в лабораторных опытах на агаризованной питательной среде путем бактеризации семян гороха, вики и люцерны.

Культурально-биохимические свойства изучались на общепринятых средах; МПА, молоке, желатине и др.

Способность усваивать углеводы, органические кислоты и аминокислоты изучалась по методу, описанному для клубеньковых бактерий Винсентом [10] и оценивалась по

интенсивности роста культуры визуально. Устойчивость к антибиотикам определялась по стерильным зонам.

Для изучения цитологии и цитохимии мутантных форм готовились препараты 3- и 20-суточных культур, которые окрашивались по Гутштейну—для выявления клеточной оболочки; нуклеоиды выявлялись по Гимза с HCl гидролизом, полисахариды—с помощью реакции Шифф-Йодная кислота (ШИК), белки—по Алферту, липиды—по Мак-Манусу. Контрольные препараты обрабатывались амилазой, пепсином и трипсином [11, 12].

Результаты и обсуждение. С помощью N-нитрозо-N-метилмочевины, которая дает разнообразный спектр изменчивости, были получены формы, резистентные к антибиотикам, всего 103 культуры. Из всех полученных мутантов вирулентность сохранили лишь 20 культур, причем некоторые из них изменили специфичность к своему растению-хозяину и образовали клубеньки на вике и люцерне. Родительский штамм № 144 образовал клубеньки только на горохе. После повторных проверок некоторые мутанты потеряли способность образовывать клубеньки на новом хозяине—люцерне. Из 9 измененных культур вирулентными для люцерны остались 5.

Клубеньки на люцерне, образованные мутантами *Rhizobium leguminosarum*, содержали бактериальные клетки в виде мелких палочек (рис. 1), которые были выделены в чистую культуру.

Измененные по специфичности мутанты, как исходные, так и пассированные через люцерну, через 3 года сохранили свою устойчивость к тем антибиотикам, на которых они выделялись. Штаммы с неизменной специфичностью частично потеряли устойчивость к антибиотикам, но отличались от родительского штамма по другим признакам.

Все изученные мутантные формы имели более замедленный рост по сравнению с родительским штаммом и изменили морфологию колоний. Подобные изменения были описаны и для мутантов *Rhizobium trifolii*, образовавших клубеньки на люцерне [8].

Мутанты, как и исходный штамм № 144, не росли на МПА (кроме № 144—98), не пептонизировали и не сбразивали молоко, не разжижали желатину. Мутанты с измененной специфичностью, в отличие от исходной культуры и мутантов с неизменившейся специфичностью, образовали меньше биомассы (табл. 1). Изучение углеводного питания (табл. 1) показало, что многие мутанты отличаются от исходного штамма, а также друг от друга не только по устойчивости к антибиотикам, но и по способности усваивать углеводы и органические кислоты. Так, культуры №№ 144—98, 144—45, 144—47 росли на ксилозе, в то время как исходная культура и остальные мутанты не росли. Крахмал усваивался мутантом 144—45, а декстрин—№№ 144—45, 144—47 и 144—98. На других углеводах у мутантов также заметны различия в интенсивности роста.

Органические кислоты (табл. 1) плохо усваивались всеми штаммами, тем не менее и в этом случае заметны различия. Мутанты №№ 144—64 и 144—93 росли, хотя и слабо, на сульфаниловой кислоте, а №№



Рис. Клубеньковые бактерии в клубеньках люцерны. Окраска кристалл-фиолетовым, 1500X а. Люцерновый штамм № 21; б. мутант горохового штамма, № 144—54.

Таблица 1
Некоторые культурально-физиологические особенности мутантных форм *Rhizobium leguminosarum**

Штаммы	Метка по устойчивости к антибиотикам	Специфичность к растению	Образование биомассы, %	Интенсивность роста						
				на углеводах				на органических кислотах		
				раманоза	ксилоза	крахмал	декстрин	сульфаниловая	фталевая	бензойная
144—исходный	—	горох	100	+	—	—	—	—	+	—
144—45	пенициллин	горох	100,2	++	++	+	+	—	—	—
144—47	эритромицин	горох	99,3	+++	++	—	++	—	—	—
144—61	хлортетрациклин	люцерна	93,4	++	—	—	—	—	—	—
144—64	хлортетрациклин	люцерна	74,8	+	—	—	—	+	+	—
144—67	хлортетрациклин	люцерна	64,7	+	—	—	—	+	+	+
144—93	эритромицин	люцерна	81,4	+	—	—	—	+	+	+
144—98	эритромицин	люцерна	81,5	++	++	—	+	—	—	+

* Данные приведены только в отношении тех углеводов и органических кислот, на которых больше заметны различия.

144—64, 144—67 и 144—93—на бензойной. И, напротив, мутанты №№ 144—61, 144—98, 144—45 и 144—47 на фталевой кислоте не дали роста. Аминокислоты в качестве углеродного питания не усваивались всеми изученными культурами.

Различия между исходным штаммом и его мутантами в способности усваивать те или иные углеводы и органические кислоты говорят о глубоких физиологических изменениях, происшедших в результате мутагенеза. В литературе также есть указание на то, что мутанты *Rh. leguminosarum* с различной устойчивостью к пенициллину отличались друг от друга по способности сбраживать молоко и ферментировать фруктозу [13]. Необходимо отметить, что какой-либо корреляции между специфичностью мутантов и их углеродным питанием не наблюдалось.

Изучение морфологии клеток выявило, что мутанты с измененной специфичностью имеют более мелкие клетки, чем исходный штамм и «гороховые» мутанты.

Выявлены также различия между культурами в наличии и локализации в клетках полисахаридов и кислых белков. Гликоген в 3-суточной культуре не обнаружен у мутантов, образовавших клубеньки на люцерне. «Гороховые» мутанты (144—45 и 144—47), как и родительский штамм № 144, содержали в клетках гликоген, хотя и в небольших количествах. Кроме того, имеются различия в локализации полисахаридов в капсуле, клеточной оболочке и цитоплазме клеток мутантов. Все мутантные формы, как и исходная культура, дали положительную реакцию на кислые белки, но отличались локализацией белков в клетках. Между «гороховыми» и большинством «люцерновых» мутантов особенно заметных различий не наблюдалось.

Интересные закономерности выявлены у мутантов с измененной специфичностью после выделения их из клубеньков люцерны. Пассированные через люцерну мутанты, сохранив свою метку по устойчивости к антибиотикам, заметно изменились по содержанию полисахаридов, кислых белков и липидов в клеточной оболочке (табл. 2). Если клеточная оболочка исходных мутантов давала положительную реакцию на полисахариды и кислые белки, то после пассажа у этих культур реакция была отрицательной. Исключение в отношении кислых белков составлял штамм № 144—93. С другой стороны, липиды в клеточной оболочке отсутствовали у исходных мутантов (кроме № 144—98) и были выявлены при усилении свойств специфичности после пассажа через люцерну. Надо заметить, что штамм № 21—*Rhizobium meliloti* также отличался от горохового № 144 наличием липидов в клеточной оболочке.

Имеющиеся литературные данные [1—5] об изменении вирулентности и эффективности клубеньковых бактерий при повышении их устойчивости к отдельным антибиотикам, а также их способность в природе перекрестно заражать другие виды бобовых [14, 15] облегчают задачу получения мутантов с измененной специфичностью.

Таблица 2

Изменения некоторых цитохимических признаков клеточной оболочки у мутантов с измененной специфичностью после пассажа через люцерну*

Штаммы	Специфичность к растению	Полисахариды		Кислые белки		Липиды	
		исходная культура	после пассажа	исходная культура	после пассажа	исходная культура	после пассажа
144—исходный	горох	+	—	—	—	—	—
144—61 мутант	люцерна	+	—	+	±	—	+
144—64 мутант	люцерна	+	—	+	—	—	—
144—67 мутант	люцерна	+	—	+	—	—	+
144—93 мутант	люцерна	+	—	+	—	—	+
144—98 мутант	люцерна	+	—	+	—	+	+

- * +—положительная реакция;
±—слабоположительная реакция;
—отрицательная реакция.

В результате проведенных работ из 103 мутантов, резистентных к антибиотикам, 5 изменили свою специфичность. Изучение свойств мутантов с измененной специфичностью и сравнение их с родительским штаммом и мутантами, не изменившими специфичность, выявили некоторые общие признаки, связанные с изменением симбиоза.

«Люцерновые» мутанты имели более мелкие клетки, замедленный рост и пониженную способность к накоплению биомассы в отличие от мутантов, не изменивших специфичность. По этим признакам они приближаются к культуре *Rhizobium meliloti*. Кроме того, отмечены изменения в содержании полисахаридов, белков и липидов в клеточной оболочке после пассажа через новое растение-хозяина, что, очевидно, связано с антигенными свойствами, с вирулентностью и специфичностью культуры. Полученные данные дают возможность углубить начатые исследования.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 28.VII 1976 г.

Ե. Ն. Ավագուհյան, Մ. Վ. Հովսեփյան, Ի. Հ. Կարապետյան, Թ. Հ. Ստեփանյան

RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM-ի ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄՈՐՖՈ-
ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԵՎ ԲԶՋԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ԿԱՊՎԱԾ ՆՐԱՆՑ ՍՊԵՑԻՖԻԿՈՒԹՅԱՆ ՓՈՓՈԽՄԱՆ ՀԵՏ

Ա մ փ ն փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել են ոլոռի պալարաբազտերիանների մուտանտային ձևերի առանձնահատկությունները, որոնք իրենց ուրույնությունը փոփոխել են տեր-բույսի նկատմամբ: Մուտանտները, որոնք առվույտի արմատների վրա առաջացնում են պալարիկներ, տարբերվում են իրենց ծնողական ձևերից բյուր-

ների ավելի փոքր չափերով, դանդաղեցված աճով, այս կամ այն ածխաջրերի և օրգանական թթուների յուրացման առանձնահատկություններով, սպիտակուցների, պոլիսախարիդների, լիպիդների առկայությամբ և տեղաբաշխմամբ: Բազմիցս մուտանտային ձևերով առավելագույն բույսերի վարակման և հետադա մեկուսացման շնորհիվ, ամրապնդվել է ուրույնություն տեր-բույսի նկատմամբ, որն ուղեկցվում է պալարաբակտերիաների բջջաթաղանթում պոլիսախարիդների թթու սպիտակուցների, լիպիդների պարունակության փոփոխմամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Danery J. T., Alexander M.* Soil Sci., 108, 3, 209—216, 1969.
2. *Hendry G. S., Jordan D. C.* Canad. J. Microbiol., 15, 7, 671—675, 1969.
3. *Schwinghamer E. A. J.* Microbiol., 10, 2, 221—233, 1964.
4. *Schwinghamer E. A. J.* Microbiol. and Serol., 33, 2, 121—136, 1967.
5. *Zelazna-Kowalska I.* Plant and Soil, spec., 67—71, 1971.
6. *Класен В. П.* Тр. Латв. с.-х. акад., 85, 9—12, 1974.
7. *Levin R. A., Montgomery M. P.* Plant and Soil, 41, 3, 669—676, 1974.
8. *Имшенецкий А. А., Парийская А. Н.* Микробиол., 42, 2, 298—300, 1973.
9. *Balassa G.* Bacteriol. Revis., 27, 2, 228—241, 1963.
10. *Vincent J. M.* A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford and Edinburgh, 1970.
11. *Пешков М. А.* Цитология бактерий. М.—Л., 1955.
12. *Пирс Э.* Гистохимия. М., 1962.
13. *Pegchoudhury Paromita, Venkataraman G. S.* Zbl. Bacteriol., Parasitenk., Infektion-skrankh. und Hyg., 2, 129, 3—4, 247—262, 1974.
14. *Wilson J. K.* Soil. Sci., 58, 61, 1944.
15. *Разумовская Э. Г.* Тр. Петергофского биохимическ. ин-та ЛГУ, 19, 3—11, 1965.